

Beteiligung von *Neospora caninum* bei Rinderaborten in Nordbayern



Stephanie Christina Sörgel

Aus dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Amtsleitung: Prof. Dr. Volker Hingst
eingereicht über das
Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

Beteiligung von *Neospora caninum* bei Rinderaborten in Nordbayern

Inaugural – Dissertation zur
Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig – Maximilians – Universität München

von
Stephanie Christina Sörgel
aus Eckental

München 2008

Gedruckt mit der Genehmigung
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig – Maximilians – Universität München

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Schmahl

Koreferent: Univ.- Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion:
8. Februar 2008

*...meinen Lieben,
vor allem aber
Sarah-Julie & Adrian-Emilio!*

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.	Einleitung
2.	Literaturübersicht
2.1	Beschreibung von <i>Neospora caninum</i>
2.1.1	Taxonomische Einordnung
2.1.2	Historisches
2.1.3	Struktur und Biologie
2.2	Aborte beim Rind
2.2.1	Aborte allgemein
2.2.2	Aborte mit Beteiligung von <i>Neospora caninum</i>
2.3	Diagnostik
2.3.1	Direkte Nachweismethoden
2.3.1.1	Histologie
2.3.1.2	Immunhistologie
2.3.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)
2.3.1.4	In vitro
2.3.2	Indirekte Nachweismethoden
2.3.2.1	ELISA
2.3.2.2	Western Blot
3.	Material und Methode
3.1	Untersuchungsmaterial
3.2	Direkte Nachweismethoden
3.2.1	Anfertigung von Gewebeschnitten für die Histologie und Immunhistochemischen Färbungen
3.2.2	Durchführung der immunhistochemischen Färbung
3.2.3	PCR
3.2.3.1	Homogenisieren
3.2.3.2	Extraktion
3.2.3.3	Konventionelle PCR
3.2.3.4	Real Time PCR: SYBR Green
3.2.3.5	Real Time PCR: TaqMan Sondentechnik
3.3	Indirekte Nachweismethoden
3.3.1	ELISA
3.3.2	ELISA p38
3.3.3	Western Blot Technik
4.	Ergebnisse
4.1	Allgemeine Ergebnisse
4.1.1	Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung mittels Kulturverfahren
4.1.2	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung auf Chlamydien und Coxiellen
4.1.3	Ergebnisse der histologischen Untersuchung auf Pilze
4.1.4	Ergebnisse der virologischen Untersuchung BVD-Virus

4.2	Ergebnisse der direkten Nachweisverfahren	66
4.2.1	Pathomorphologische und immunhistochemische Befunde	66
4.2.1.1	Makroskopische und histologische Befunde	66
4.2.1.2	Immunhistologische Befunde	70
4.2.2	Ergebnisse der PCR-Methoden	73
4.2.2.1	Konventionelle PCR	74
4.2.2.2	Real Time PCR: SYBR Green	77
4.2.2.3	Real Time PCR: TaqMan Sondentechnik	87
4.2.2.4	Vergleich der Ergebnisse der drei durchgeführten PCR-Methoden	89
4.3	Ergebnisse der indirekten Nachweisverfahren	90
4.3.1	ELISA-Methoden	90
4.3.1.1	ELISA (LGL Erlangen)	90
4.3.1.2	p38 ELISA (FLI Wusterhausen)	91
4.3.2	Western Blot (FLI Wusterhausen)	91
4.4	Ergebnisse aller Methoden im Vergleich	92
5.	Diskussion	95
5.1	Vorkommen und Verbreitung von <i>Neospora caninum</i>	95
5.2	Pathomorphologie	99
5.3	Methoden	109
5.3.1	Histopathologie	110
5.3.2	Immunhistochemie	113
5.3.3	PCR	117
5.3.4	Serologie	122
5.4	Bedeutung als Aborterreger	131
6	Zusammenfassung	134
7	Summary	136
8	Literaturverzeichnis	138
9	Danksagung und Lebenslauf	161

ABKÜRZUNGEN:

(A)	Absorption
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin Biotin Komplex
al.	aliter, Mitarbeiter
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
APK	kommerzieller Waschpuffer
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, weltweite Sammlung Biologischer Sequenzen
Bp	Basenpaar
BVD	bovines Virusdiarrhoe
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CCD	Charge Coupled Device
cm	Zentimeter
Ct	Cycle Threshold
DAT	direkter Agglutinationstest
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Nukleotidmix
ds	doppelsträngig
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
F	Fluoreszenz
Fa.	Firma
Fam.	Familie
FAM	6-Carboxy-Fluoreszin (Farbstoff)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLI	Friedrich Loeffler Institut
G	Guanin
g	Gramm
GHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
H.	Hammondia
H.-E.	Hämalaun- Eosin
IBR	infektiöse bovine Rhinotracheitis
IFAT	Indirekter Immunofluoreszenz Antikörpertest
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IPV	infektiöse pustulöse Vulvovaginitis
k.A.	keine Angabe
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L.	Leptospira
LAB/LSAB	Labeled Avidin/Streptavidin Biotin
LGL	Landesuntersuchungsamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

M	männlich
Min	Minuten
MKS	Maul- und Klauenseuche
mA	Milli-Ampere
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikro-Mol
µm	Mikrometer
N.	Neospora
NaClO ₄	Natriumperchlorat
Nr.	Nummer
NTC	No Template Control (Leerprobe)
Nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	Protein
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pg	Pikogramm
pmol	PikoMol
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Sek	Sekunden
sp.	Spezies
spp.	Spezies (Pl.)
SSL	Scheitel-Steiß-Länge
Subfam.	Subfamilie
subsp.	Subspezies
T	Thymin
(T)	Temperatur
T _m	Temperature melting= Schmelzpunkt
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-Tetra-Methyl-Rhodamin (Farbstoff)
TBE	Tris- Borat EDTA- Puffer
T.gondii	Toxoplasma gondii
U	Unit
UV	ultraviolett
VR	kommerzielles Verstärker-Reagenz
W	weiblich

1. Einleitung

Neospora caninum ist ein einzelliger Parasit und phylogenetisch eng mit *Toxoplasma gondii* verwandt (ELLIS et al, 1994). Er wurde erstmals von BJERKAS et al. (1984) im Zusammenhang mit Erkrankungen bei Hunden in Norwegen beschrieben und kommt mittlerweile weltweit vor. Hauptbedeutung kommt dem Parasiten als Verwerfensursache beim Rind zu, wobei der genaue Pathomechanismus noch nicht bekannt ist (HEYDORN und MEHLHORN, 2001).

Endwirt ist der Hund, der infektiöse Oozysten mit dem Kot ausscheidet (DUBEY, 2003; GONDIM et al., 2001; McALLISTER et al., 1998; SCHARES et al., 2001a).

Die Tatsachen, dass einerseits Aborte zu hohen wirtschaftlichen Einbußen in der Landwirtschaft führen (DUBEY und LINDSAY, 1996; THURMOND und HIETALA, 1997b; DUBEY, 1999; TREES et al., 1999; BARLING et al., 2001b), und andererseits Hunde in der Übertragung der Erreger eine gewisse Rolle spielen, haben zu heftigen Diskussionen und Anfeindungen zwischen Landwirten und Hundebesitzern geführt.

Sowohl in der Presse als auch in anderen Medien wie Rundfunk und Fernsehen wurde dieses Thema sehr heftig diskutiert und gipfelte in der Forderung eines Hersbrucker Stadtrats, Hunde zum Speicheltest zu verpflichten, um deren Exkremente eindeutig zurückverfolgen zu können.



Abb. 1: Beispiele aus der Presse

So beschäftigten sich neben vielen landwirtschaftlichen Zeitschriften, Gemeindeblättern, Mitteilungen von Bauernverbänden und Tiergesundheitsdiensten, auch Umweltsekretariate verschiedener Bundesländer, Universitäten, Institute für Parasitologie, die Bundestierärztekammer, das Friedrich Löffler Institut und sogar das Bundesamt für Veterinärwesen mit dieser Thematik.

Häufig wird die komplexe Materie, bei der der Hund wesentlich weniger Bedeutung haben dürfte als ursprünglich angenommen, sehr einseitig dargestellt.

Außerdem fehlen vielerorts systematische Untersuchungen zum Vorkommen von *Neospora caninum* in der Rinderpopulation.

Wenn Angaben zur Verbreitung des Parasiten existieren, dann beruhen diese meist rein auf serologischem Datenmaterial.

Aus diesem Grund entstand die Idee, diese Lücke für den nordbayerischen Raum zu schließen und die im Lauf eines Jahres an das LGL in Erlangen eingegangenen Verwerfensfälle beim Rind auf das Vorkommen von *Neospora caninum* hin zu untersuchen.

Dabei kamen verschiedene Methoden wie Histologie, Immunhistochemie, PCR (Polymerase Kettenreaktion) und Serologie zum Einsatz.

Auf diese Weise sollte versucht werden, die tatsächliche Bedeutung des Einzellers als Aborterreger besser abschätzen zu können. Weiterhin bestand das Ziel, dann eine geeignete Kombination von Methoden zu etablieren, die bei vertretbarem, finanziellem Aufwand eine möglichst sichere Diagnostik von *Neospora caninum* in der Routineuntersuchung ermöglicht.

2. Literaturübersicht

2.1 Beschreibung von *Neospora caninum*

2.1.1 Taxonomische Einordnung

Bis heute wird die Klassifizierung, Taxonomie und Nomenklatur von *Neospora* und anderen gewebszystenbildenden Kokzidien kontrovers diskutiert.

Zum einen ist der Lebenszyklus der verschiedenen Kokzidienarten erst seit kurzem bekannt bzw. noch nicht vollständig geklärt (HEYDORN und MEHLHORN, 2001).

Desweiteren sind noch nicht alle Spezies der Apicomplexa beschrieben worden. Man geht davon aus, dass möglicherweise nur 1% dieser Arten bisher erforscht ist.

Letztendlich richtete man das Augenmerk bei der Suche vornehmlich auf Arten mit veterinärmedizinischem oder humanmedizinischem Interesse (COX, 1994).

Neospora caninum wird zur Zeit – wie auch Arten der Gattungen *Hammondia* und *Toxoplasma* - zu den zystenbildenden Kokzidien im Stamm der Apicomplexa gezählt (N.N.; Vorlesungs-Handout des Institutes für Parasitologie der LMU München).

Aufgrund traditioneller phänotypischer Charakteristika wie Morphologie, Lebenszyklus und Lokalisation der verschiedenen Entwicklungsstadien ordnen ROMMEL et al. (2000) den Parasiten wie folgt ein:

Tab. 1: Einordnung von *Neospora caninum*

Stamm	Apicomplexa
Klasse	Sporozoea
Unterklasse	Coccidia
Ordnung	Eucoccidiida
Unterordnung	Eimeriina
Familie	Isosporidae
Gattung	Neospora
Art	<i>Neospora caninum</i>

Neben *Neospora caninum* existiert noch eine weitere Art der Gattung *Neospora*, *Neospora hughesi*, die bei Pferden neurologische Erkrankungen verursacht (MARSH et al., 1998). Uneinigkeit in der Taxonomie von *Neospora caninum* besteht in der genauen Zuordnung des Erregers innerhalb der Unterordnung Eimeriina.

ROMMEL et al. (2000) ordnen *Neospora caninum* zwar in die Familie Isosporidae ein, weitere molekularbiologische Untersuchungen zur Klärung der phylogenetischen Beziehung der zystenbildenden Kokzidien lassen jedoch weitere Umgruppierungen erwarten.

Nach einem Vergleich von ausgewählten Gensequenzen der kleinen Untereinheit der ribosomalen Ribonucleinsäure (rRNA) von *Neospora caninum* und anderen protozoären Parasiten des Stammes Apicomplexa ordnete ELLIS et al. (1994) *Neospora caninum* als ein Schwestertaxon zu *Toxoplasma gondii* und damit in die Familie der Sarcocystidae ein.

GUO und JOHNSON (1995) konnten jedoch bei einem Vergleich der Genome von *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* und weiteren Sarcocystis-Arten mit der Random Amplified Polymorphic Desoxyribonucleinsäure (DNA-) Polymerasekettenreaktion (PCR) keine engere Relation zwischen *Neospora caninum* und *Toxoplasma gondii* ermitteln. *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* haben zwar ein ähnliches, aber nicht identisches Wirtsspektrum. Weiterhin unterscheiden sie sich auch in der Biologie und Epidemiologie.

Bei dem Vergleich der gesamten Gensequenz der großen Untereinheit der rRNA von *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* und *Hammondia heydorni* konnte MUGRIDGE et al. (1999) aufzeigen, dass diese Arten auch unter Berücksichtigung ihrer Endwirtspezifität zwei verschiedenen Linien angehören.

Mehrere morphologische und biologische Merkmale lassen darauf schließen, dass *Neospora*-Arten näher mit *Hammondia heydorni* als mit *Toxoplasma gondii* oder *Hammondia hammondi* verwandt sind (ELLIS et al., 1999; MUGRIDGE et al., 1999). So fungieren Hunde für *Neospora caninum* wie für *Hammondia heydorni* gleichermaßen als Zwischen- wie auch als Endwirt. Die Oozysten dieser beiden Erreger können rein morphologisch nicht voneinander unterschieden werden. Beide Parasiten sind auch in vielen Tierarten weit verbreitet (McALLISTER et al., 1998a). Man geht daher heute davon aus, dass *Neospora caninum* und *Hammondia heydorni* die eine und *Toxoplasma gondii* und *Hammondia hammondi* die andere phylogenetische Linie bilden.

Nach Ansicht der Autoren HEYDORN und MEHLHORN (2002) ist die Schaffung der Gattung Neospora ein Verstoß gegen die internationale Regelung zur zoologischen Nomenklatur. Ihrer Meinung nach existieren nur 3 gültige Genera:

Toxoplasma gondii

Hammondia heydorni

Isospora

Das einzige charakteristische Kriterium zur Unterscheidung der erst kürzlich beschriebenen Art *Hammondia heydorni* von *Neospora caninum* beruhte – wie oft fälschlich in der Literatur beschreiben - auf dem Fehlen einer parasitophoren Vakuole. Nach Meinung der Autoren wurden auch keine Kriterien präsentiert, die die Schaffung eines neuen Genus rechtfertigen würden.

Aktuell wird versucht, eine neue und möglichst umfassende Klassifikation der Kokzidien unter Berücksichtigung der molekularen und phänotypischen Charakteristika zu schaffen. Eine solche Einordnung sollte die Phylogenie der taxonomischen Gruppen widerspiegeln, indem sie sie so exakt wie möglich beschreibt, um für viele Jahre eine stabile Klassifikation herzustellen. Um eine möglichst hohe Akzeptanz sicherzustellen, sollte sich ein internationales Expertenteam um eine solche Klassifikation bemühen (TENTER et al., 1997).

2.1.2 Historisches

1984 beschrieben BJERKAS et al. (1984) eine mit Myositis und Enzephalitis einhergehende Erkrankung bei wenige Monate alten Hunden in Norwegen. Histologisch konnten im Gehirn und im Muskelgewebe Toxoplasma-ähnliche Protozoen nachgewiesen werden. Ultrastrukturell wies der Erreger jedoch Unterschiede auf, ferner waren im Serum der Tiere keine Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* nachweisbar (BJERKAS und PRESTHUS, 1988). Retrospektiv fanden DUBEY et al. (1988a) bei zehn Hunden ähnlich gelagerte Fälle, bei denen fälschlicherweise eine Toxoplasmose diagnostiziert worden war. Erste Fälle ließen sich sogar bis auf das Jahr 1957 zurückdatieren (DUBEY et al., 1990c). DUBEY (1988a) gab dem Erreger, der sich ultrastrukturell von allen bisher bekannten Kokzidien unterschied, daher den Namen *Neospora caninum*.

Im Jahre 1989 wurde *Neospora caninum* erstmals im Zusammenhang mit Rinderaborten in Kalifornien beschrieben (THILSTED und DUBEY, 1989). Weitere Untersuchungen in der gleichen Region führten zur Erkenntnis, dass es sich hierbei um einen durchaus häufig nachzuweisenden Erreger handeln muss. Im Jahre 1996 wird erstmals über *Neospora caninum*-assoziierte Verkaltungen in Deutschland berichtet (CONRATHS et al., 1996). Mittlerweile sind entsprechende Fälle aus zahlreichen Ländern der Europäischen Union sowie aus den Vereinigten Staaten von Amerika, aus Afrika, Asien, Australien und Neuseeland bekannt.

Im Jahre 1998 gelang der Nachweis, dass der Hund einen der Endwirte von *Neospora caninum* darstellt. McALLISTER et al. (1998b) infizierten Mäuse mit in vitro isolierten Zysten aus einem natürlich infizierten Kalb, die sich daraufhin zu Gewebezysten entwickelten. Diese Zysten wurden an Hunde verfüttert, und im Kot der Hunde konnten Oozysten von *Neospora caninum* nachgewiesen werden. Im Jahre 2001 konnten BASSO et al. (2001) erstmals Oozysten im Kot natürlich infizierter Hunde nachweisen.

2.1.3

Struktur und Biologie

Neospora caninum ist ein obligat intrazellulärer Parasit. Die Entwicklung verläuft über einen Zwischen- und einen Endwirt. Während der Hund Endwirt ist, kommen als Zwischenwirte zahlreiche Tierarten in Betracht, neben dem Rind auch Schafe (DUBEY et al., 1990b; HELMICK et al., 2002), Ziegen (DUBEY et al., 1992a), Pferde (DUBEY und PORTERFIELD, 1990), Schweine (HELMICK et al., 2002), wildlebende Tiere wie Hirsche (DUBEY et al., 1996b, DUBEY et al., 1999a; FERROGLIO und ROSSI, 2001; LINDSAY et al., 2002) und Füchse (BUXTON et al., 1997a), aber auch Wasserbüffel (HUONG et al., 1998), Kojoten (LINDSAY et al., 1996c), Kamele und das Rhinoceros (WILLIAMS et al., 2002). Experimente mit Katzen (McALLISTER et al., 1998a) und europäischen Füchsen (SCHARES et al., 2002b) verliefen hingegen negativ.

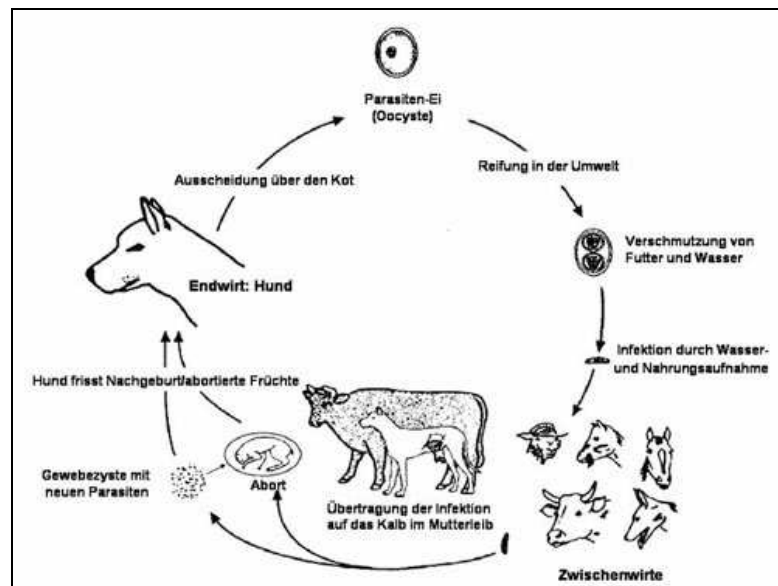


Abb. 2: Schema des Entwicklungszyklus von *Neospora caninum* (nach LÖSCHENBERGER et al., 2000).

Der Hund scheidet 8 bis 13 Tage nach der oralen Aufnahme von Körpergewebe infizierter Zwischenwirte (z.B. vom Rind, Schaf oder Ziege) unsporulierte Oozysten mit dem Kot aus (Präpatenz) (McALLISTER et al., 1998a; ROMMEL et al., 2000; SCHARES et al., 2001; GONDIM et al., 2002). Auch das Fressen einer erregerrhaltigen Nachgeburt (DIJKSTRA et al., 2001) kann zur Ausscheidung dieser Dauerstadien führen. Die Dauer der Oozystenausscheidung (Patenz) beträgt ca. 11-20 Tage.

Die Sporulation, d. h. die Bildung infektiöser sporulierter Oozysten, findet in der Außenwelt statt und dauert ca. 3 Tage. Nach der Sporulation besitzt jede Oozyste zwei Sporozysten mit je vier Sporozoiten. Oozysten können wahrscheinlich mehrere Wochen bis Monate im Futter oder im Wasser überleben (SCHARES und CONRATHS, 2007).



Abb. 3: Oozyste mit ca. 12 μ m
(Quelle: Institut für Parasitologie der Universität Bern)

Werden die infektiösen *Neospora caninum* Oozysten oral aufgenommen, sind sie in der Lage, Zwischenwirte zu infizieren (DeMAREZ et al., 1999; GONDIM et al., 2004b; TREES et al., 2002). In dem Zwischenwirt findet eine ungeschlechtliche Vermehrung (Merogonie) durch Endodyogenie (Zweiteilung) statt. Diese Teilung erfolgt sehr rasch und führt zur Bildung von Tachyzoiten (griechisch „takhu“=schnell).

Der Vorgang findet intrazellulär innerhalb parasitophorer Vakuolen in vielen verschiedenen Zellen statt, u. a. in Nerven-, Muskel- und Epithelzellen, Leber- und Nierenparenchymzellen, Makrophagen, Fibroblasten sowie Endothelzellen (CUMMINGS et al., 1988; DUBEY et al., 1988a; BJERKAS und PRESTHUS, 1989; DUBEY und LINDSAY, 1989b; SPEER und DUBEY, 1989).

Innerhalb einer Wirtszelle können auf diese Weise bis zu 100 Tachyzoiten entstehen. Die Tachyzoiten können vom Muttertier auf den Fetus übertragen werden (vertikale Übertragung). Die diaplazentare Übertragung auf die Jungtiere scheint bei Pflanzenfressern die wichtigste der verschiedenen Übertragungsmöglichkeiten zu sein (ANDERSON et al., 1997; ANDERSON et al., 2000; BJÖRKMAN et al., 1996; PARÉ et al., 1994; PARÉ et al., 1996; SCHARES et al., 1998; THURMOND et al., 1997; WOUDA et al., 1998b) und kann sich im gleichen Tier mehrmals wiederholen (BARR et al., 1993). So lässt sich auch erklären, dass sich die Erkrankung über Generationen in einer Herde fortsetzen kann (DIJKSTRA et al., 2002).

Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion können sich Tachyzoiten insbesondere im Nervengewebe und in der Retina festsetzen. Dort bilden sie eine Zystenhülle aus (Podozysten) und nehmen langsame Teilungen vor (DUBEY et al., 1988a; LINDSAY et al., 1993). Die als Bradyzoiten (griechisch „bradu“=langsam) zu bezeichnenden Parasiten bilden eine stabile Wand aus (HEMPHILL, 1999). Diese Stadien können über mehrere Jahre reaktionslos im Gewebe liegen und verursachen dabei keinerlei klinische Symptome (DUBEY und LINDSAY, 1996). Der genaue Synthesevorgang ist bisher jedoch noch nicht geklärt.

Neben der Übertragung durch Oozysten wurde auch die Möglichkeit der Übertragung über Kolostrum auf neugeborenen Kälber (UGGLA et al., 1998), über das Fressen der Nachgeburt durch adulte Rinder (DAVISON et al., 2001) und über Bullensperma (ORTEGA- MORA et al., 2003) diskutiert. Bislang liegen jedoch keine Hinweise vor, dass die genannten Übertragungswege im Feld eine nennenswerte Rolle spielen (DAVISON et al., 2001; FERRE et al., 2005).

2.2 Aborte beim Rind

2.2.1 Aborte allgemein

Weltweit wird in den Rinderpopulationen mit einer Abortrate von 2-5% gerechnet (AHLERS und GRUNERT, 1997). DE KRUIF (1993) geht von einer Inzidenz von 3% nach dem 3.Trächtigkeitsmonat aus. Die Aufklärungsquote, d.h. der Nachweis eines ursächlichen Erregers wird in der Literatur mit ca. 30% angegeben (WEBER et al., 1997).

Den Verkaltungen beim Rind können dabei sowohl infektiöse wie nicht-infektiöse Ursachen zugrunde liegen (AHLERS und GRUNERT, 1997). Als nicht-infektiöse Abortursachen sind insbesondere die Nebenwirkungen verschiedener Medikamente (z. B. steroidale Antiphlogistika), Intoxikationen, schwere Allgemeinerkrankungen oder auch physikalische Ursachen wie Stöße, Schläge, Stürze mit Traumatisierung des graviden Uterus zu nennen (DE KRUIF, 1993). Zu den infektiösen Ursachen zählen Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten.

Noch vor wenigen Jahren herrschte die Meinung vor, die Plazenta sei für virale Erreger nicht passierbar. Inzwischen sind jedoch weltweit Viren als Aborterreger nachgewiesen worden (STRAUB, 1982).

Als virale Aborterreger beim Rind werden in der Literatur Herpesviren (IBR/IPV) (FREY, 1997a, FREY, 1997b), Pestviren (BVDV) (MOENNING, 1997; BJÖRKMAN et al., 2000), Morbilliviren (Rinderpest) (HARDER, 1997), Parvo-, Bluetongue-, Myxo-, MKS –und Akabanevirus erwähnt (DE KRUIF, 1993).

Im deutschsprachigen Raum dürfte dem BVD-Virus dabei die größte Bedeutung zukommen, wobei das Virus im norddeutschen Raum häufiger (12-13%) als im süddeutschen Raum (bis zu 7%) als Abortursache ermittelt werden kann (HEIL-FRANKE et al., 1993; LOTTHAMMER, 1991). Im Zeitraum von 1991 bis 1995 lag die Nachweisquote von BVD-Virus bei Rinderaborten in Nordbayern sogar unter einem Prozent (WEBER et al., 1997). Die Dunkelziffer dürfte jedoch höher liegen, da der Erreger in nicht ganz frischem Abortmaterial bereits abgestorben sein kann und somit mittels Zellkultur nicht mehr nachweisbar ist.

Zu den bakteriellen Aborterregern zählen *Arcanobacterium pyogenes*, Listerien, Salmonellen, Brucellen, Pasteurellen, *Campylobacter fetus subsp. fetus*, Leptospiren, *Bacillus cereus* und *Bacillus licheniformis*, Staphylokokken, Streptokokken, Mykobakterien sowie Chlamydien, Coxiellen und Mykoplasmen (DE KRUIF, 1993, GEDEK et al., 1993; LÄMMLER und HARTWIGK, 1995, MÜLLER et al., 2005; AGERHOLM et al., 1997; MITCHELL et al., 1986; RYAN, 1970).

Laut WEBER et al. (1997) sind Bakterien als infektiöse Abortursache mit einer Nachweisquote zwischen 13 und 33% in Deutschland von größter Bedeutung. In einer nordbayerischen Studie wurde 1993 als häufigster bakterieller Aborterreger *Arcanobacterium pyogenes* mit 3,4% genannt, gefolgt von Staphylokokken, *Coxiella burnetti* und anderen, in geringer Zahl vertretenen bakteriellen Erregern (HEIL-FRANKE et al., 1993). MÜLLER et al. (2004) fanden in den Jahren 2002 und 2003 für den nordbayerischen Raum folgende Prozentwerte für bakterielle Aborte: *Arcanobacterium pyogenes* 9%, *Listeria monozytogenes* 3%, Salmonellen 1% und *Coxiella burnetti* 1%.

Pilze sind als sporadische Aborterreger ebenfalls von Bedeutung. Mykotische Aborte treten vor allem in den Wintermonaten auf; ihre Rate kann bis zu 10% betragen (SCHWEIGHART, 1991). Als Erreger kommen insbesondere Schimmelpilze wie *Aspergillus fumigatus* sowie Zygomyzeten wie *Mortierella wolfii*, *Absidia* sp. und *Mucor* sp., zu einem geringeren Teil auch Hefen (verschiedene *Candida*-Arten) in Betracht (GEDEK et al., 1993). Einer nordbayerischen Studie zufolge wurde *Aspergillus fumigatus* in 3,4% und *Mucor* sp. in 1,0% der Rinderaborte ermittelt (HEIL-FRANKE et al., 1993). 1993 gelang es PLAGEMANN und WEBER (1993) erstmals im deutschsprachigen Raum den Schimmelpilz *Mortierella wolfi* aus Nachgeburten von abortierenden Kühen zu isolieren. Weiter konnten Müller und Mitarbeiter (2004) in Nordbayern für die Jahre 2002 und 2003 Schimmelpilze (Typ *Aspergillus* oder *Mucor*) in 2% aller Sektionsbefunde nachweisen.

Verwerfensfälle bei Rindern können auch auf Parasiten zurückgeführt werden (WEBER et al., 1997). Die Nachweisrate der durch Parasiten ausgelösten Verkalbungen liegt im deutschsprachigen Raum unter 1 % (HÄSSIG et al., 1991). Zu den differentialdiagnostisch relevanten Parasiten zählen *Toxoplasma gondii* und *Hammondia heydorni*, seltener auch *Trichomonas fetus*, *Babesia divergens*, *Babesia major*, *Babesia bovis*, *Babesia bigeminata* und *Babesia ovata*. Im Zuge der immer größer werdenden Bedeutung von *Neospora caninum* als Abortursache und den stetig verbesserten Testverfahren sind diese Prozentzahlen vermutlich nach oben hin zu korrigieren.

2.2.2

Aborte mit Beteiligung von *Neospora caninum*

Neospora caninum stellt weltweit einen der am häufigsten im Zusammenhang mit Rinderaborten diagnostizierten Erreger dar (DUBEY et al., 2007). SCHARES et al. (2000) konnten in Deutschland (Nordrhein-Westfalen) - je nach Untersuchungsmethode - den Parasiten bei 13-22% der Rinderaborte nachweisen. Im nordbayerischen Raum konnten MÜLLER und seine Mitarbeiter (2004) für die Jahre 2002 und 2003 in 2% der Sektionsbefunde *Neospora caninum* als Aborterreger ermitteln. Epidemiologischen Untersuchungen zufolge geht man in der Schweiz von einer Häufigkeit von 21 bis 29% (GOTTSTEIN et al., 1998, SAGER et al., 2001) und in Frankreich von etwa 21% (PITEL et al., 2001) aus. Untersuchungen in Spanien ergaben eine Häufigkeit von *Neospora caninum* bei Rinderaborten von 32% bis 57% (GONZALES et al., 2000), in den Niederlanden von etwa 17% (WOUDA et al., 1997b) und in Belgien sowie in England von etwa 12% (OTTER et al., 1995, DAVISON et al., 1999a, DE MEERSCHMAN et al., 2002, SCHOCK et al., 2000). Außerhalb Europas liegen die Nachweishäufigkeiten teils noch höher, in Mexiko bei 35% (MORALES et al., 2001), in Brasilien bei 39% (CORBELLINI et al., 2002) oder in einzelnen Staaten von Amerika sogar bei über 40% (ANDERSON et al., 1995). In Afrika hingegen konnten JARDINE und LAST (1995) in weniger als 2% der Rinderaborte *Neospora caninum* nachweisen.

Eine Infektion mit *Neospora caninum* geht mit erheblichen wirtschaftlichen Verlusten in der Landwirtschaft einher (DUBEY und LINDSAY, 1996, DUBEY, 1999, TREES et al., 1999). Die Verluste bestehen dabei neben der erhöhten Abortrate auch in vermehrten Totgeburten, sowie in der Geburt lebensschwacher oder klinisch inapparenter, jedoch infizierter Kälber, die den Erreger im Bestand weiter verbreiten können (ANDERSON et al., 1997; BARR et al., 1991 und 1993; DE MEERSCHMAN et al., 2002 und 2005; DUBEY et al., 1990; DUBEY und DeLAHUNTA, 1993). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine seropositive Kuh ein seropositives Kalb zur Welt bringt, ist dabei recht hoch. SCHARES und Mitarbeiter (1998) konnten zeigen, dass bei 15 Kälbern, die von zehn seropositiven Kühen abstammen, 14 Kälber eine Serokonversion aufwiesen.

Werden diese persistent infizierten weiblichen Tiere zur Zucht verwendet, so geben sie die Infektion fast bei jeder Trächtigkeit an ihre Nachkommen weiter (SCHARES und CONRATHS, 2007). Feldstudien erbrachten eine Übertragungseffizienz von 73-100% (DAVISON et al., 1999a; PARÉ et al., 1996; THURMOND und HIETALA, 1997; SCHARES et al., 1998).

Infizierte Tiere können außerdem eine reduzierte Milchleistung sowie geringere Gewichtszunahmen aufweisen (BARLING et al., 2001b; THURMOND und HIETALA, 1997b; WALDNER et al., 2002). Statistische Analysen haben ergeben, dass mit *Neospora caninum* infizierte, d. h. seropositive Rinder im Vergleich zu seronegativen Tieren im Durchschnitt pro Tag 1,1 bis 1,4 kg weniger Milch mit zusätzlich reduziertem Milchfettgehalt produzieren (THURMOND et al., 1997).

Studien in den Vereinigten Staaten von Amerika ergaben, dass alleine die Infektion – auch ohne Abortgeschehen – negative Auswirkungen auf die Milchleistung der infizierten Tiere hatte (THURMOND und HIETALA, 1997b). Felduntersuchungen aus Kanada zeigten jedoch, dass die wirtschaftlichen Schäden durch Milchleistungseinbußen hauptsächlich in solchen Herden auftraten, in denen *Neospora caninum* auch Aborte verursacht hatte (HOBSON et al., 2002).

Die klinische Symptomatik beschränkt sich bei infizierten graviden Färsen und Kühen auf Verkaltungen und Totgeburten, die Tiere selbst sind ansonsten klinisch gesund. Abortfälle können vom dritten Monat bis zum Ende der Trächtigkeit auftreten (Tag 110 bis 260 post inseminationem) (CONRATHS und SCHARES, 2004). Die meisten *Neospora caninum* assoziierten Aborte werden ab dem zweiten Drittel der Trächtigkeit beobachtet (ANDERSON et al., 1991; HATTEL et al., 1998; OTTER et al., 1995; SÖNDGEN et al., 2001; WOUDE et al., 1997). In der frühen Trächtigkeit wird der Fötus nach dem Fruchttod vollständig resorbiert, in späteren Stadien kann es neben Aborten mit Ausstoß der toten Früchte auch zur Mumifikation der infizierten Feten kommen.

Abortfälle im Zusammenhang mit *Neospora caninum*-Infektionen konnten bei Rindern aller Altersklassen unabhängig von der Anzahl der Laktationen beobachtet werden (DUBEY, 2003). Wiederholte Aborte bei ein und demselben Tier sind ebenfalls möglich (ANDERSON et al., 1995; OBENDORF et al., 1995; THURMOND et al., 1997). Genaue Aussagen über die Wahrscheinlichkeit eines Mehrfachabortes sind zurzeit noch nicht möglich. Der Anteil von Rindern mit *Neospora caninum*-bedingten Mehrfachaborten dürfte dabei unter 5% liegen (ANDERSON et al., 1995; DANNAT et al., 1995; OBENDORF et al., 1995). Laut DUBEY und LINDSAY (1996) ist die Geburt mehrerer infizierter klinisch gesunder Kälber wahrscheinlicher als ein wiederholtes Abortgeschehen beim gleichen Tier.

Laut TREES und anderen (1994) ist ein Abort umso wahrscheinlicher, je höher der Antikörper-Titer gegen *Neospora caninum* im Blut des betreffenden Muttertieres ist. Bei einem niedrigeren Titer ist die Wahrscheinlichkeit für einen Abort geringer, ein Verwerfensgeschehen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Genaue Aussagen über die Abortfrequenz sind kaum zu treffen, weil die meisten betroffenen Tiere aus wirtschaftlichen Überlegungen heraus aus dem Bestand eliminiert werden; längerfristige Beobachtungen sind daher nicht möglich (DANNAT et al., 1995; MOEN et al., 1998). Auch die These von THURMOND und HIETALA (1997a) und auch DIJKSTRA und Kollegen (2003), das Abortrisiko kongenital infizierter Rinder würde mit jeder Trächtigkeit abnehmen, kann nur bei entsprechender Lebensdauer der Tiere überprüft werden.

Aborte können das ganze Jahr über auftreten (ANDERSON et al., 1991; THURMOND et al., 1995). Nach Studien aus Kalifornien und den Niederlanden scheint ein mildes und feuchtes Klima die Überlebensfähigkeit der infektiösen Stadien in der Umwelt zu begünstigen (ANDERSON et al., 1991; THURMOND et al., 1995; MOEN et al., 1998; HEMPHILL et al., 2000a). Auch nach Studien in Österreich bestätigte sich laut JOACHIM und EDELHOFER (2004), dass eine geringe Niederschlagsmenge und Wärme das Risiko für Seropositivität erhöhen. MAGNINO et al. (1999) erklären die sich z. T. erheblich unterscheidenden Seroprävalenzen der einzelnen Länder mit den unterschiedlichen klimatischen Einflüssen.

In Bezug auf die Rassendispositionen ist zu erwähnen, dass die meisten *Neospora caninum*-assoziierten Aborte bei Milchrassen beobachtet wurden (ANDERSON et al., 1991 und 1995; BARR et al., 1991a; WOUDA et al., 1995). In Spanien konnten QUINTANILLA-GOZALO et al. (1999) in einer Studie zeigen, dass die Seroprävalenz in Milchbetrieben bei 35,9%, in Mastbetrieben hingegen bei nur 17,9% lag. HEMPHILL et al. (2000a) machten dafür die unterschiedlichen Haltungs- und Produktionssysteme verantwortlich. Studien aus Frankreich (OULD-AMROUCHE et al., 1999) und Dänemark (JENSEN et al., 1999) ergaben hingegen keine Rassendisposition.

Es werden zwei Verlaufsformen der Infektion mit *Neospora caninum* beschrieben: In betroffenen Herden kann es einerseits zu einer konstant erhöhten Abortrate kommen (endemische Aborte), andererseits zu einem zeitlich gehäuftem, seuchenähnlichen Verwerfensgeschehen (epidemische Aborte) (SCHARES et al., 2002). Der seuchenähnliche Verlauf - hier verkalbt ein großer Prozentsatz der Herde (10- 70%, MOEN et al., 1998; SCHARES et al., 2002a) innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes - ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Erreger in größeren Mengen über den Endwirt, z. B. den infizierten Hofhund, in eine ungeschützte Herde eingetragen wird (SCHARES et al., 1997). Die infolge Infektion mit *Neospora caninum* konstant erhöhte Abortrate ist durch sporadische Verkalbungen charakterisiert. JENSEN et al. (1999) gehen von einer Erhöhung der Verwerfensrate um den Faktor 3 bis 5 im Vergleich zu nicht infizierten Tieren aus.

Zurückzuführen sind diese Abortfälle aller Wahrscheinlichkeit nach auf den diaplazentaren Übertragungsweg von der Kuh auf den Fötus, der von DUBEY und LINDSAY (1996) erstmals nachgewiesen wurde.

Die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung des Erregers von einer seropositiven Kuh auf den Fetus wird mit 73%-100% angegeben (BARR et al., 1993; DAVISON et al., 1999a; PARÉ et al., 1996; THURMOND und HIETALA, 1997; SCHARES et al., 1998).

Dauerhaft *Neospora caninum* assoziierte Abortprobleme werden häufiger beobachtet als seuchenhaftes Abortgeschehen und manifestieren sich in Herden in Form einer nur leicht erhöhten Abortrate, die oft vom Halter unbemerkt bleibt (SCHARES und CONRATHS, 2007).

Wenige der diaplazentar infizierten Kälber sterben erst nach der Geburt, dann zumeist innerhalb der ersten vier Lebenswochen (DUBEY und LINDSAY, 1996). Die meisten hingegen überleben und zeigen keinerlei klinische Symptome, tragen den Erreger aber in sich und übertragen ihn wiederum mit etwa 90% Wahrscheinlichkeit auf die nächste Generation. Auf diese Weise bleibt ein Bestand über lange Zeit infiziert (BJÖRKMAN et al., 1996; HALL et al., 2005; HEMPHILL, 1999, HEMPHILL und GOTTSTEIN, 2000; SCHARES et al., 1998). Die infizierten Tiere weisen ihrerseits ebenfalls eine erhöhte Verwerfensrate auf (THURMOND et al., 1995).

2.3

Diagnostik

Zum Nachweis einer Infektion mit *Neospora caninum* stehen verschiedene diagnostische Methoden zur Verfügung. Wichtig ist dabei auch die Abgrenzung zu anderen differentialdiagnostisch relevanten Aborterregern (HEMPHILL, 1999). Man unterscheidet dabei zwischen direktem und indirektem Erregernachweis.

Zu den direkten Nachweismethoden zählen die Histopathologie, die Immunhistologie, die Polymerasenkettenreaktion (PCR) und die In-vitro Isolierung des Erregers aus infiziertem Gewebe (DUBEY und LINDSAY, 1996; ELLIS et al., 1998; HEMPILL, 1999).

Ein sicherer Nachweis aus Abortmaterial gelingt nicht immer, weil die Zahl der im fötalen Gewebe vorhandenen Parasitenstadien sehr gering sein kann oder das Material aufgrund fortgeschrittener Autolyse für eine histologische oder immunhistochemische Untersuchung nicht mehr geeignet ist (CONRATHS und SCHARES, 2004).

Die indirekten Nachweismethoden, die vor allem zur Diagnostik am lebenden Tier eingesetzt werden, bestehen ausschließlich aus serologischen Verfahren.

Sie basieren auf der Erkennung von Antikörpern, die spezifisch gegen *Neospora caninum* Antigene gerichtet sind (HEMPILL, 1999). Experimentell infizierte Rinder serokonvertieren innerhalb von 7 bis 22 Tagen nach der Infektion. Die Antikörper bleiben in der Regel über viele Monate, wenn nicht Jahre oder lebenslang nachweisbar (CONRATHS und SCHARES, 2004).

Im Handel sind verschiedene Testkits erhältlich, die auf dem Prinzip des indirekten Immunofluoreszenz-Antikörpertestes (IFAT), des Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA), des direkten Agglutinationstestes oder auf der Western-Blot Technik beruhen.

2.3.1 Direkte Nachweismethoden

Bei diesen Verfahren wird nach Tachyzoiten, Gewebezysten und charakteristischen histopathologischen Veränderungen gesucht (HEMPHILL, 1999). Im Folgenden sollen die Histopathologie, Immunhistologie, PCR und die In-vitro Isolierung näher vorgestellt werden.

2.3.1.1 Histologie

Bei der Untersuchung abortierter Feten kommt der histopathologischen Untersuchung eine zentrale Bedeutung zu. Gerade zum Nachweis eines *Neospora caninum* assoziierten Abortes ist eine histopathologische Untersuchung unabdingbar (REICHEL, 1996; REICHEL und DRAKE, 1996).

Zu den Organen, in denen morphologische Veränderungen zu erwarten sind, zählen insbesondere Gehirn, Herz und Leber, daneben auch Muskulatur und Plazenta (SAGER und GOTTSTEIN, 1996).

Abortierte Feten, die mit *Neospora caninum* infiziert sind, können entweder frisch aber auch mumifiziert sein oder sich auch im Stadium der fortgeschrittenen Autolyse befinden. Makroskopisch weisen die Feten im Allgemeinen keine Veränderungen auf (CONRATHS und SCHARES, 1999).

Bisweilen werden in der Literatur blasse bis weiße Herde in der Skelettmuskulatur und im Herz beschrieben (CONRATHS und SCHARES, 1999).

Bezüglich der Eihäute ist zu erwähnen, dass sich auch in der Plazenta histologische Veränderungen finden lassen. Da die Eihäute jedoch schnell in Autolyse übergehen, spielen sie diagnostisch gesehen eine untergeordnete Rolle (WOUDA, 2000).

Mit dem Lichtmikroskop werden Gewebe untersucht, die zuvor mit Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet wurden. Schnitte von 2-4µm werden auf einem Objektträger aufgezogen und gefärbt (GOTTSTEIN et al., 1999).

Vor allem in Zentralnervensystem, Herz, Skelettmuskulatur und Leber lassen sich histopathologisch degenerative und entzündliche Veränderungen feststellen (ILLANES et al., 1994; SCHOCK et al., 2000).

Als charakteristische histologische Veränderung gilt die nicht-eitrige Enzephalomyelitis. Oft ist diese als eine multifokal nekrotisierende Enzephalitis mit perivaskulären Rundzellinfiltraten und Gliazellproliferation beschrieben, wobei Nekrosen eher selten auftreten (BARR et al., 1990; OTTER et al., 1995; SAGER et al., 2001).

Die soeben genannten Gliazellproliferationen treten vor allem bei Feten auf, die im letzten Trächtigkeitsdrittel verworfen wurden (DUBEY et al., 1992b).

In einigen Fällen können auch Kalzifizierungen beobachtet werden (BOULTON et al., 1995; DUBEY et al., 1998a).

Desweiteren wurden nicht eitrige Entzündungen der Nieren, der Lunge, einzelner Lymphknoten, des Muskelgewebes und der Eihaut beobachtet (ROMMEL et al., 2000).

Prinzipiell ist nach BARR und anderen (1990) und auch nach WOUDA und seinen Mitarbeitern (1997b) mit Entzündungserscheinungen in der Skelettmuskulatur, Herz, Leber, Lunge, Niere und Plazenta zu rechnen.

Nach einer Studie mit 82 Foeten wurden von BARR et al. (1990) folgende Entzündungsreaktionen in Prozentwerten festgestellt: in 100% der Fälle lag eine Enzephalitis und Myocarditis vor, bei 80% eine Entzündung der Nebenniere; 72% wiesen eine Myositis auf, 66% eine Nephritis, 62% eine Hepatitis, 53% eine Plazentitis und in 44% eine Pneumonie. Hierbei ist auch zu erwähnen, dass am Myocard hochgradige Läsionen häufig durch Autolyse maskiert werden (DUBEY und LINDSAY, 1996; DUBEY et al., 1990e).

In manchen Fällen können histologisch auch die Parasitenstadien nachgewiesen werden. Der Erregernachweis gelingt hauptsächlich im Gehirn, dem Herzen und in der Leber. Es gelingt jedoch nicht bei jedem *Neospora caninum* assoziiertem Verkälben, den Erreger selbst nachzuweisen, da seine Anzahl oft sehr gering sein kann (NIETFELD et al., 1992; OTTER et al., 1995).

Die sich schnell teilenden Tachyzoiten, die für die entzündlichen Gewebeveränderungen verantwortlich sind, können sowohl extra- als auch intrazellulär liegen (DUBEY et al., 1992b). Sie finden sich dabei vorzugsweise im zentralen Nervensystem (Gehirn, Rückenmark, Nervengewebe) und in der Herzmuskulatur, seltener hingegen in anderen Organsystemen (ROMMEL et al., 2000).

Gewebszysten lassen sich dagegen eher in Neuronen finden. PETERS und Mitarbeiter (2000) fanden jedoch auch Gewebezysten im Muskelgewebe. Sie liegen nicht in den Entzündungsherden und zeigen keine zellulären Reaktionen in den benachbarten Bereichen (OGINO et al., 1992).

Die Gewebszysten mit den sich langsam teilenden Bradyzoiten liegen reaktionslos im Wirtsgewebe, insbesondere im Gehirn und im Rückenmark (DUBEY und LINDSAY, 1996).

Der Meinung verschiedener Autoren zufolge (DUBEY et al., 1988a, DUBEY und LINDSAY, 1993) können gut entwickelte Gewebezysten von *Neospora caninum* lichtmikroskopisch von *Toxoplasma gondii*-Zysten unterschieden werden.

Die Zysten von *Neospora caninum*, die primär im Nervengewebe lokalisiert sind, weisen eine Wandstärke bis zu 4µm auf, während die Gewebezysten von *Toxoplasma gondii*, die in zahlreichen Organen zu finden sind, eine deutlich geringere Wandstärke von weniger als 1µm aufweisen.

Allerdings sind die im Gehirn von Feten lokalisierten *Neospora caninum*-Zysten oft noch sehr klein und weisen eine dünne, noch nicht vollständig entwickelte Wand auf (DUBEY und LINDSAY, 1996), so dass hier lediglich eine Verdachtsdiagnose möglich sein dürfte (CONRATHS und SCHARES, 2004).

Eine sichere Abgrenzung zu *Toxoplasma gondii* erfordert den immunhistologischen Erregernachweis (HEMPHILL, 1999).

Weiter ist zu erwähnen, dass das Vorhandensein einer wallartigen Umgebung auf eine länger bestehende Infektion mit immunologischer Reaktion des Wirtes hindeutet. Bei chronisch latent oder akut infizierten Tieren liegt hingegen keine wallartige Umgebung vor (DUBEY und LINDSAY, 1996; HEMPILL, 1999).

2.3.1.2 Immunhistologie

Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden können Entwicklungsstadien von *Neospora caninum* im Gewebe dargestellt werden (LINDSAY und DUBEY, 1989a).

Die Aufbereitung der Gewebe erfolgt identisch bei der Histologie. Zusätzlich werden die Schnitte jedoch noch rehydriert und die unspezifischen Bindungsstellen mit Ziegen Serum blockiert. Anschließend werden die Schnitte mit einem Anti-*Neospora*-Kanninchen-Hyperimmunserum inkubiert (GOTTSTEIN et al., 1999; HEMPHILL et al., 1996; PATITUCCI, 1995).

Das Prinzip der Immunhistologie beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei werden Antikörper verwendet, die an Indikatormoleküle gekoppelt sind und somit den optischen Nachweis des Antigens ermöglichen (McKENZIE, 1992; DUBEY und LINDSAY, 1996).

Als Indikatoren können entweder Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe oder Metalle dienen. Bei Verwendung von Enzymen wird ein entsprechendes Substrat zugegeben, das mit Hilfe der Enzyme umgesetzt wird. Das dabei entstehende Produkt reagiert mit einem vorgelegten Chromogen und bildet so ein gefärbtes Endprodukt, das im positiven Falle präzipitiert und das Antigen darstellt. Die am häufigsten eingesetzten Enzyme sind die alkalische Phosphatase und die Meerrettich-Peroxidase.

Grundsätzlich wird zwischen direkten und indirekten immunhistologischen Techniken unterschieden (LARSSON, 1988). Die direkten Methoden, bei denen die markierten Antikörper direkt an das entsprechende Antigen binden, werden aufgrund der relativ geringen Sensitivität heutzutage nur noch selten eingesetzt. Demgegenüber besitzen die indirekten Methoden durch Verwendung weiterer, so genannter Brückenantikörper eine deutlich höhere Sensitivität. Beispiele der indirekten Technik sind die häufig angewendeten PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase)-, APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase)-, ABC (Avidin-Biotin-Komplex)- und LAB/LSAB-(Labeled Avidin- / Streptavidin-Biotin)-Methoden (STERNBERGER et al., 1970; GUESDON et al., 1979; HSU et al., 1981; CORDELL et al., 1984).

In der vorliegenden Arbeit kam die LAB/LSAB-(Labeled Avidin- / Streptavidin-Biotin)-Methode zur Anwendung und soll im Folgenden kurz beschrieben werden.

Die Methode nutzt die starke Affinität von Avidin (aus Hühnereiweiß) bzw. Streptavidin (aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*) an Biotin (Vitamin H) (GUESDON et al., 1979). Ein Molekül Avidin kann dabei vier Moleküle Biotin binden.

Die Methode nutzt also diese starke Affinität von (Strept-) Avidin für das Vitamin Biotin zur Kopplung enzymmarkierter Avidin/Streptavidins an biotinylierten Sekundärantikörper.

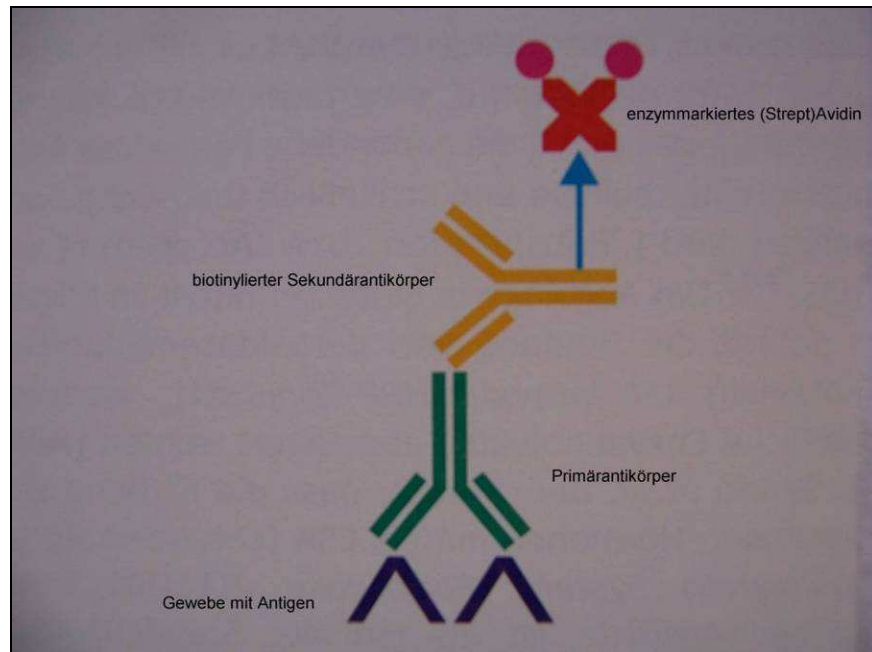


Abb. 4: Schematische Darstellung der LAB/LSAB- Methode
(nach BOENISCH et al., 2003)

Die Durchführung beinhaltet die Applikation eines Primärantikörpers, eines biotinylierten Sekundärantikörpers und des Enzym-konjugierten (Strept)Avidins.

Es handelt sich dabei um einen direkt markierten Komplex. Das Biotin ist direkt an das (Strept) Avidin gebunden (labeled).

Es entfallen also die Biotinbrücken wie bei der ABC Methode. Dadurch sind die entstehenden Komplexe erheblich kleiner als bei der ABC Methode und sterische Behinderungen werden verringert.

Neben der einfachen Handhabung der Methode kommt auch die hohe Spezifität zum Tragen.

Laut HSU ist die LAB-Methode vier bis achtmal sensitiver als die ABC-Methode (Hsu et al., 1981).

Zur Sichtbarmachung wird eine Substrat- Chromogenlösung verwendet, wobei an der Stelle des gesuchten Antigens ein Präzipitat entsteht.

Ein weiterer Vorteil gegenüber der ABC Methode ist, dass die positiven Signale deutlicher ausfallen.

2.3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um ein sehr sensitives Verfahren, bei dem ein spezifischer Teil der Erbsubstanz (DNA) mit bekannter Sequenz nachgewiesen werden kann (SAGER und GOTTSTEIN, 1996).

Dabei wird zunächst die in Doppelsträngen vorliegende DNA durch Erhitzen in Einzelstränge getrennt (WINK und WEHRLE, 1994). Am Anfang und am Ende des spezifischen Abschnitts binden so genannte Primer, Starthilfen, die das gegengleiche Muster der jeweiligen Anfangs- und End-DNA-Abschnitte besitzen. Mit Hilfe des Enzyms Polymerase wird zum dazwischen liegenden DNA-Abschnitt der jeweils komplementäre DNA-Strang synthetisiert. Der nun gebildete Doppelstrang wird durch Erhöhung der Temperatur wieder getrennt, die Bindungsstellen für die Primer sind damit wieder frei und der Vorgang kann nach dem Absinken der Temperatur wiederholt werden. Durch häufiges Wiederholen dieses Vorgangs wird eine exponentielle Vervielfältigung (Amplifizierung) dieses DNA-Abschnittes erreicht. Die so entstandenen DNA-Produkte können durch verschiedene Methoden sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

Um die molekularbiologischen Untersuchungen durchführen zu können, müssen die Proben jedoch zunächst homogenisiert und die gesamte genomische DNA extrahiert und gereinigt werden.

Eine Homogenisierung bewirkt eine gleichmäßigere Erregerverteilung in dem Gewebe und damit eine höhere Trefferquote bei der anschließenden Detektion durch die PCR.

Mit dem Verfahren der Extraktion kann in mehreren Schritten das Gewebe lysiert, die DNA isoliert und von Verunreinigungen befreit werden. Zunächst werden die Zellwände lysiert, um die DNA zugänglich zu machen. Anschließend werden Verunreinigungen wie Proteine oder Zelldetritus durch Bindung der DNA an Trägermaterialien oder durch Präzipitation und Sedimentation entfernt. Am Ende der Extraktion wird die gewonnene DNA mit geeigneten Puffern von den Trägermaterialien eluiert oder resuspendiert.

Lyse der Zellen:

Die Lyse der Zellen kann durch chaotrope Salze, Enzyme, Detergenzien, Hitze oder mechanische Zerstörung stattfinden. Im Folgenden werden jedoch nur die Lyse durch chaotrope Salze und Enzyme beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen.

Die im Lysispuffer und Bindingpuffer enthaltenen chaotropen Salze wie z.B. Guanidiniumisothiocyanat (GITC), Guanidiniumhydrochlorid (GHC) oder NaClO_4 denaturieren die Proteine der Zellwand und führen so zur Lyse der Zellen. Bei eukaryontischen Zellen lysiert dieser Vorgang auch die Kernmembran. Konzentrierte guanidiniumhaltige Lösungen

zerstören durch hydrophobe Wechselwirkungen die Sekundärstruktur von Proteinen. Da jedoch die Struktur von Nukleinsäuren erhalten bleibt, eignet sich diese Methode zur Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren (VOLKIN und CARTER, 1951; VON HIPPEL und WONG, 1964; COX, 1968; GORDON, 1972; TRAVAGLINI, 1973; XU et al., 1990; CHOMCZYNSKI et al., 1997). Natriumperchlorat (NaClO_4) bindet an Proteine und löst somit auch die Proteinanteile der DNA ab (HAMAGUCHI und GEIDUSCHEK, 1962).

Durch den Einsatz von Enzymen (Proteinase K, Lysozym, Protease, Pronase) werden die in der Zellwand enthaltenen Proteine verdaut und somit die Stabilität der Zellwand aufgehoben.

Gewinnung der DNA

Für die Gewinnung der DNA stehen Glas/Silicia/mineralisches Material auf Siliziumbasis, Salzpräzipitation, Phenol/Chloroform, Guanidium, Ionenaustauscher und die Präzipitation der DNA mit Alkohol zur Verfügung. Im Folgenden werden nur die Techniken beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit Einsatz fanden.

Bei der Technik mit Glas/Silicia/mineralischem Material wird die Adsorption von DNA an eine Matrix aus diesem Material in Anwesenheit von chaotropen Substanzen wie GITC oder Natriumperchlorat genutzt. Für die Bindung von DNA an Silicaoberflächen sind hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen sowie schwache elektrostatische Anziehungskräfte und die Abspaltung von Wasser verantwortlich. Nach der Bindung werden Proteine und Verunreinigungen mit Waschschritten entfernt. Abschließend wird die DNA unter Niedrigsalzbedingungen vom Trägermaterial eluiert.

Bei der Salzpräzipitation werden nach der Lyse der Zellen alle Zellwand- und Kernproteine durch eine hochkonzentrierte Salzlösung präzipitiert. Die Proteine werden anschließend durch Zentrifugieren sedimentiert. Die DNA, die sich im Überstand befindet, wird mit Alkohol gefällt, gewaschen und in Puffer oder Aqua bidest aufgenommen (BUFFONE und DARLINGTON, 1985; MILLER et al., 1988).

Bei der Präzipitation der DNA mit Alkohol wird im Anschluß an die Zell-Lyse die DNA durch Zugabe von Alkohol präzipitiert. Die Präzipitation erfolgt entweder mit Ethanol oder mit Isoprpanol. Durch die Zugabe von Alkohol wird den DNA-Molekülen Wasser entzogen, was zu einer Aggregation der Nukleinsäuremolekülen und zur nachfolgenden Präzipitation führt (TRAVAGLINI, 1973; WALLACE, 1987; EICKBUSCH und MOUDRIANAKIS, 1978; IBELGAUFTS, 1993). Die DNA wird durch Zentrifugieren sedimentiert, anschließend gewaschen und mit einem geeigneten Puffer in Lösung verbracht.

Anschließend können verschiedene PCR-Nachweismethoden eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit waren dies die konventionelle PCR mit anschließender Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid und die Real Time PCR (SYBR Green- und TaqMan-Methode), bei der das DNA-Fragment sofort über Fluoreszenzsignale dargestellt wird. Im Folgenden werden die angewandten Verfahren einzeln beschrieben:

Konventionelle PCR

Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) ist eine In-vitro- Methode um spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Hierbei wird der zu amplifizierende Bereich, das Amplikon, durch einen Forward-Primer und einen Reverse-Primer und von einem Enzym, der DNA-Polymerase, vervielfältigt. Die Methode basiert auf der wiederholten Abfolge verschiedener Temperaturzyklen bei denen Nacheinander die Schritte Denaturierung, Anlagerung (Primer Annealing) und Extension ablaufen. Jeder Zyklus verdoppelt im Idealfall die ursprünglich vorhandene Menge an Ziel- DNA. Da die amplifizierten Sequenzen wiederum selbst als Matritze für die Vervielfältigung dienen, können so innerhalb weniger Zyklen enzymatisch Milliarden von Kopien synthetisiert werden. Während die ursprünglich geringe DNA-Menge nicht direkt nachweisbar wäre, können die nun vervielfältigten Sequenzen über eine Gelelektrophorese aufgetrennt werden und mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht werden.

Um Amplifikationen unerwünschter und unspezifischer DNA-Abschnitte zu vermeiden, werden sehr spezifische Primerpaare ausgewählt. Die Primer werden nach Abgleich mit Sequenzierungsdaten, die aus eigenen Isolaten und aus Gendatenbanken stammen, ausgewählt. Dabei ist es wichtig, möglichst stark konservierte Bereiche der Gensequenz auszuwählen, die keinen Mutationen unterliegen und die keine Übereinstimmung mit Sequenzen anderer Spezies aufweisen.

Real Time PCR

Bei der Real Time PCR wird nicht das Endprodukt der Reaktion nachgewiesen, sondern ein Fluoreszenzsignal, das während der DNA-Vermehrung durch Anregung mit UV-Licht entsteht. Dieses Verfahren ist bei Mitverwendung bekannter Standards zur Quantifizierung der eingesetzten Ausgangsmenge geeignet (MACKAY et al., 2007).

Real Time PCR mit SYBR Green

Bei dieser Methode kann die Synthese der entstehenden PCR-Produkte über ein kontinuierliches Monitoring während der Reaktion in „Echtzeit“ verfolgt werden, da sich ein Fluoreszenzfarbstoff, SYBR Green I, bereits im Reaktionsansatz befindet.

Das Prinzip dieser Methode ist analog der konventionellen PCR. Durch den Wegfall der Gelelektrophorese ist zudem die Kontaminationsgefahr und die Möglichkeit von Pipettierfehlern wesentlich reduziert.

Der Cyaninfarbstoff SYBR Green I bindet weitgehend unspezifisch an doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Anregung etwa 1000-mal stärker als der freie Farbstoff. Auf diese Weise kann besonders die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sichtbar gemacht werden (WITTWER et al., 1997; MORRISON et al., 1998).

Nach jedem Reaktionszyklus wird das Fluoreszenzsignal gemessen, das proportional zur DNA-Produktmenge ist (HIGUCHI et al., 1993; HEID et al., 1996). Die Messung erfolgt dabei am Ende der Primer Annealing Phase.

In der Denaturierungsphase liegt kaum doppelsträngige DNA vor, man misst also nur eine sehr schwache Fluoreszenz. Während der Annealing- und besonders am Ende der Elongationsphase liegt der größte Anteil der DNA in Doppelsträngen vor und die maximale Menge an SYBR Green I ist gebunden. Durch Messung der Fluoreszenz am Ende der Primer Annealingphase ist so die steigende Menge an amplifizierter DNA von Zyklus zu Zyklus detektierbar.

Allerdings entsteht dieses Fluoreszenzsignal auch bei der Entstehung von unspezifischen PCR-Produkten und Primerdimeren. Deshalb wird im Anschluß an die PCR immer eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt.

Dabei wird die Temperatur des PCR-Produktes kontinuierlich angehoben und gleichzeitig das Fluoreszenzsignal gemessen. Ab einer bestimmten Temperatur liegt nur noch die Hälfte des PCR-Produktes in Doppelsträngen vor. Diesen Punkt bezeichnet man als Schmelzpunkt T_m des PCR-Produktes. Wenn die negativierte Ableitung der Fluoreszenz über die Temperatur ($-d(F)/dT$) berechnet wird, entsteht ein Peak an der Stelle der höchsten Empfindlichkeit. Die Lage dieses Peaks ist eine Funktion der Länge und des GC- Gehalts des entstandenen PCR-Produktes und stellt eine Spezifizierung der Probe dar. Nur PCR-Produkte mit einem eindeutigen Peak im Bereich des Schmelzpunkts werden als positiv bewertet.

Real Time PCR mit TaqMan Sonden Technik

Das Prinzip dieser PCR Methode beruht auf dem Einsatz von sequenzspezifischen Primern und einer ebenfalls sequenzspezifischen Sonde.

TaqMan Sonden sind einzelsträngige Oligonukleotide, die inmitten eines Amplikons binden können und mit zwei Farbstoffen gekennzeichnet sind.

Diese beiden Fluoreszenzfarbstoffe, ein Reporterfarbstoff und ein Quencherfarbstoff, liegen in einem Abstand von 3 bis etwa 30 Basen und markieren die Sonde an beiden Enden.

Solange die Sonde intakt ist, gibt der Reporterfarbstoff bei Anregung nur ein schwaches Fluoreszenzsignal ab. Aufgrund der räumlichen Nähe des Reporters zum Quencher kommt es zu einem Fluoreszenz-Energietransfers vom Reporter zum Quencher. Der Quencher (Farbstoff am 3'Ende) absorbiert die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes FAM am 5'Ende.

Bei der Abkühlung nach der Denaturierung bindet die Sonde bevor die Annealingphase erreicht ist. Dies geschieht, weil die Sonde einen höheren Schmelzpunkt als die Primer hat. Nachdem die Primer gebunden haben, beginnt die Polymerase sofort den komplementären Strang zu bilden und die Sonde zu hydrolysieren.

Die im Kit (HotStarTaq Master Mix Kit, Fa. Qiagen) enthaltene Taq-Polymerase besitzt eine 5'-3' Polymeraseaktivität und eine 5'-3' Exonucleaseaktivität.

Durch die 5'-3' Exonuclease Aktivität der DNA-Polymerase wird die Sonde also hydrolysiert und Reporter und Quencher getrennt, wodurch der Reporterfarbstoff nun mit voller Intensität fluoresziert. Die Fluoreszenz kann nun bei der für den verwendeten Farbstoff geeigneten Wellenlänge gemessen werden.

Mit jedem neu synthetisierten DNA-Strang wird weiterer fluoreszierender Farbstoff freigesetzt. Somit ist das resultierende Fluoreszenzsignal proportional zu der synthetisierten DNA-Menge.

Im Anschluss der PCR berechnet das Gerät automatisch den Ct-Wert (Cycle Threshold), d.h. die Anzahl an Zyklen nach denen die Fluoreszenz den Schwellenwert überschreitet.

2.3.1.4 In vitro

Die Isolierung der Parasiten aus frischem, möglichst unter aseptischen Bedingungen entnommenem Abortmaterial ist sehr aufwendig und nicht in jedem Fall erfolgreich (SAGER und GOTTSTEIN, 1996).

In einer Studie von CONRAD und Mitarbeitern (1993a) gelang nur in 2 von 100 abortierten Feten der tatsächliche Nachweis von *Neospora caninum*.

Als Gründe dafür lassen sich die Kontamination mit Bakterien und das notwendige Vorhandensein von intakten Gewebezysten nennen (GOTTSTEIN et al., 1999; HEMPHILL, 1999).

Bei dieser Methode werden Tachyzoiten sowohl in Frischzellen als auch in etablierten Zelllinien kultiviert. Eine Kultivierung in Versuchstieren oder Hühnerembryos ist ebenfalls möglich. Sie wird vor allem an wissenschaftlichen Instituten durchgeführt, um weitere Parasitenisolate für die Erforschung der Neosporose zu gewinnen.

2.3.2 Indirekte Nachweismethoden

Mit Hilfe der indirekten Nachweisverfahren werden Antikörper gegen *Neospora caninum* nachgewiesen.

Die wichtigsten Verfahren sind der indirekte Immunofluoreszenz-Antikörpertest (IFAT), der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), der Immunblot und der direkte Agglutinationstest. Im Folgenden soll nur auf den ELISA und den Immunoblot – diejenigen Verfahren, die im praktischen Teil der Arbeit zur Anwendung kamen - kurz eingegangen werden.

2.3.2.1 ELISA

Bei dieser insgesamt sehr sensitiven Technik wird die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper mit einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen. Im positiven Fall bildet das Antigen mit dem Antikörper einen Immunkomplex. Das anschließend zugefügte Enzymkonjugat bindet an den Antikörper. Das Enzym kann wie bei den meisten Methoden Meerrettichperoxidase oder auch ein anderes pflanzliches, ein bakterielles oder tierisches Enzym sein.

Dieses Enzym katalysiert seinerseits eine Reaktion, bei der ein Chromogen zu einem Farbstoff umgesetzt wird, der proportional zur Menge der gebundenen Antikörper in der Probe ist (LÖFFLER u. PETRIDES, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde der HerdChek-Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen *Neospora caninum* der Firma IDEXX Laboratories (Maine, USA) eingesetzt. Das genaue Vorgehen wird näher im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue ELISA-Systeme entwickelt mit dem Ziel, die Sensitivität und die Spezifität weiter zu verbessern (BJÖRKMANN et al., 1994a; OSAWA et al., 1998; PARÉ et al., 1995a; SCHARES et al., 2002a; WILLIAMS et al., 1999).

Ein Nachteil der serologischen Methoden ist allgemein die Gefahr von Kreuzreaktionen mit *Toxoplasma gondii* (DUBEY und BEATTIE, 1988). Aus diesem Grund wird an vielen Instituten, darunter auch am Friedrich Loeffler Institut (Wusterhausen) sowie am Institut für Parasitologie der Universität Bern an geeigneten Western-Blot –Tests gearbeitet (SAGER u. GOTTSTEIN, 1996).

2.3.2.2 Western Blot

Bei der Western-Blot Technik werden die Antigene durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Trägermembran übertragen und dort im positiven Falle mit Hilfe gebundener Antikörper nachgewiesen (VOET und VOET, 1994). Der Immunoblot wird aufgrund der aufwendigen Durchführung nur selten bei der Routineuntersuchung von Seren eingesetzt, gelegentlich aber als Zusatzmethode zu anderen Tests. Bei der Identifikation immunodominanter Antigene, also solchen Oberflächenproteinen, die zu starken Abwehrreaktionen des Organismus führen, spielt er jedoch eine wichtige Rolle.

1992 wurden die ersten immunodominanten Antigene von *Neospora caninum* identifiziert. Laut BARTA und DUBEY (1992) liegen mindestens 20 verschiedene Proteine mit einer molekularen Masse von 16 KiloDalton (kDa) bis 80 kDa vor. BJERKAS et al. (1994) charakterisierten vier größere und mehrere kleinere *Neospora caninum* Antigene. Bei den größeren handelt es sich um Moleküle mit einer Masse von 17 kDa (p17), 29 bzw. 30 kDa (p29/30) und 37 kDa (p37). Hauptziele bei serologischen Untersuchungen stellen vor allem die Moleküle p29/30 und p37 dar (ATKINSON et al., 2000). Neuen Studien zufolge handelt es sich bei p29 und p30 vermutlich um die gleichen Proteine (JENKINS et al., 1997). Diese beiden Antigene wurden nicht in Lysaten mit *Toxoplasma gondii* gefunden.

Obwohl *Neospora caninum* und *Toxoplasma gondii* mehrere gemeinsame Antigene aufweisen, teilen sie dennoch nicht ihre immundominanten Antigene. Sollte eine Kreuzreaktion auftreten, so ist diese nicht in Zusammenhang mit einem der immunodominanten Antigene zu sehen, da diese hochspezifisch für *Neospora caninum* sind (BJERKAS et al., 1994; PARÉ et al., 1995a; HOWE et al., 1998; SCHARES et al., 1998; ATKINSON et al., 2000). Nach SCHARES et al. (1998,1999) liegt ein positives Ergebnis bei einem Blot vor, wenn mindestens 2 von 4 spezifischen immunodominanten Antigenbanden reagieren. Bei Seren mit sehr niedrigen Antikörper-Titern können einige Antigene nicht detektiert werden (ATKINSON et al., 2000).

3. Material und Methode

Alle praktischen Arbeiten wurden am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Erlangen durchgeführt. Alle diesbezüglich eingebundenen Labore sind nach DIN EN ISO/IEC 17025 zertifiziert.

3.1 Untersuchungsmaterial

In der Zeit von Februar 2005 bis Februar 2006 wurden insgesamt 232 Fälle (Tab.2) von Rinderaborten in die Pathologie des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Erlangen eingesandt. Dabei handelte es sich um 205 abortierte Feten, in 125 Fällen mit zugehöriger Eihaut. 105 Feten waren männlichen, 83 weiblichen Geschlechts, in 17 Fällen war keine Geschlechtsbestimmung möglich. In 22 Fällen handelte es sich um Zwillingsträchtigkeiten, in einem Fall lag eine Drillingsträchtigkeit vor. 49-mal wurde ausschließlich die Plazenta eingesandt.

Das eingesandte Material wurde zunächst einer makroskopischen Beurteilung unterzogen, insbesondere im Hinblick auf eventuelle Missbildungen oder entzündliche Veränderungen. Außerdem wurde bei den Feten die Scheitelsteißlänge ermittelt, um Rückschlüsse auf das Alter der Feten ziehen zu können. Für die histologische Untersuchung wurden Gewebestücke von etwa 2cm x 2cm x 1cm entnommen und in 4% wässriges Formalin verbracht. Routinemäßig wurden Stücke von Plazenta, Gehirn – hier jeweils drei verschiedene Lokalisationen (Großhirn, Stammhirn und Kleinhirn) -, daneben Herz- und Skelettmuskulatur sowie Lunge und Leber entnommen; gelegentlich wurden weitere Organe wie Niere, Nebenniere oder Milz einer histologischen Bearbeitung zugeführt.

Für die bakteriologische Untersuchung wurden Gewebeproben von Plazenta, fetalem Magen sowie Lunge, Leber, Niere und gelegentlich auch Milz des Fetus entnommen und zunächst in Petrischalen überführt; die Plazenta- und Magenproben dienten zugleich als Material zur bakterioskopischen Untersuchung auf Chlamydien und Coxiellen.

Für die virologische Untersuchung auf BVD-Virus wurden verschiedene fetale Organe, insbesondere Gehirn, Milz, Lymphknoten sowie Labmagen und Speicheldrüse entnommen und in Petrischalen überführt.

Darüber hinaus wurden im Rahmen der Sektion, falls möglich, einige ml Körperhöhlenflüssigkeit aufgefangen. War keine entsprechende Flüssigkeit vorhanden, so wurde versucht, fetales Blut zu gewinnen. Die Proben wurden anschließend 10 Minuten bei 500g zentrifugiert und einer serologischen Untersuchung auf *Neospora caninum* zugeführt. Der übrig gebliebene Rest wurde für eine eventuelle weitere Diagnostik bei -80°C asserviert.

Für die PCR auf *Neospora caninum* wurden möglich große Gewebeproben vom fetalen Gehirn oder, falls der Fetus nicht vorlag, von der Plazenta entnommen, anschließend in Petrischalen überführt und ebenfalls bei -80°C asserviert.

Weiterhin wurden- sofern bekannt- auch das exakte Alter oder eine Schätzung über die Scheitelsteißlänge, das Geschlecht, Einzel- oder Mehrlingsträchtigkeit, der Verwerfensmonat und der Landkreis mit in die Statistik aufgenommen.

Tabelle 2: Überblick über alle eingegangenen Abortfälle

Nr. fort-laufend	Nr. LGL	Material		SSL (in cm)	Abort monat	Mehrlings- geburt	Ge- schlecht
		Fetus	Eihaut				
1	177/178	X		72/78	8	Zwillinge	W/W
2	184/185	X		52/54	7	Zwillinge	M/M
3	221	X		49	5		M
4	222/223	X		81/93	8	Zwillinge	M/M
5	233	X		80	7		M
6	239	X		65	7		M
7	241	X		92	9		M
8	245	X		85	8		W
9	255	X		75	7		k. A.
10	273	X		90	7		M
11	280		X	-	7		-
12	304	X		49	6		W
13	324	X		98	9		W
14	325	X	X	26	4		W
15	326		X	-	-		-
16	329		X	-	8		-
17	332	X		90	9		W
18	339	X		64	8		M
19	358	X		90	9		M
20	372	X	X	92	8		M
21	373		X	-	9		-
22	374	X	X	58	7		M
23	376		X	-	6		-
24	380	X	X	58	5		W
25	392	X		19	4 (Mumie)		-
26	403	X	X	56	6		M
27	406	X		100	9		M
28	416		X	-	-		-
29	418/419	X	X	24/27	7	Zwillinge	M/W
30	420	X	X	66	7		M
31	423	X		69	7		W
32	425	X		50	6		M
33	442	X		67	7		W
34	445		X	-	-		-
35	450	X	X	20	4		W
36	451	X	X	62	6		M
37	452	X	X	34	5		M
38	457	X	X	87	9		W
39	458		X	-	7		-
40	460	X	X	60	7		W
41	463	X		95	9		k. A.
42	473		X	-	-		-
43	476	X	X	80	7		M
44	477	X	X	79	7		W
45	478	X	X	15	3		k. A.
46	494	X	X	95	9		M

47	500		X	-	8		-
48	504	X	X	59	7		M
49	523	X	X	68	9		W
50	525		X	-	-		-
51	536		X	-	-		-
52	540/541	X	X	38	6	Zwillinge	M/W
53	545/546	X	X	k.A.	-	Zwillinge	k. A.
54	552	X	X	58	7		M
55	553	X	X	25	5		M
56	556	X	X	64	9		M
57	557	X	X	36	6		W
58	565		X	-	6		-
59	566		X	-	6		-
60	578	X		45	6		M
61	583	X	X	52	6		M
62	585	X	X	72	7		M
63	594	X	X	49	6		M
64	595	X	X	83	9		W
65	598	X	X	40	5		W
66	601	X	X	63	7		W
67	629		X	-	7		-
68	631		X	-	7		-
69	638	X	X	37	5		W
70	639	X	X	80	8		M
71	647	X	X	93	8		W
72	654	X		3	1		k. A.
73	660	X	X	70	7		M
74	661		X	-	-		-
75	664	X		64	8		M
76	665	X	X	36	5		M
77	666	X	X	75	6		W
78	670	X	X	89	8		M
79	674	X	X	50	6		W
80	687	X		62	7		M
81	695	X		60	7		M
82	696	X		82	8		M
83	702	X	X	81	7		M
84	706	X		57	7		W
85	712	X	X	42	5		W
86	717	X	X	91	9		M
87	727	X	X	70	7		W
88	731	X	X	82	6		M
89	744	X	X	63	7		M
90	747	X		94	9		W
91	753	X		89	8		W
92	755	X	X	69	8		W
93	760	X	X	47	6		M
94	761	X	X	38	6		M
95	768	X	X	80	8		M
96	770/771	X	X	62/68	6	Zwillinge	M/W
97	772/773	X	X	27/27	3	Zwillinge	M/W
98	774		X	-	6		-
99	782	X	X	42	6		W

100	783	X		49	5		W
101	787/788	X	X	42/44	5	Zwillinge	M/W
102	791	X		60	7		M
103	792		X	-	-		-
104	795/796	X		53/56	7	Zwillinge	M/W
105	797	X	X	102	9		W
106	805	X	X	59	7		W
107	808/809	X	X	36/36	5	Zwillinge	M/W
108	811	X	X	59	6		M
109	821	X	X	68	7		M
110	822		X	-	8		-
111	823		X	-	8		-
112	824	X	X	34	5		W
113	825	X		46	7		M
114	840		X	-	-		-
115	841		X	-	7		-
116	842	X	X	59	6		M
117	844	X		102	9		k. A.
118	848	X		75	8		W
119	849	X		39	5		W
120	855	X		68	7		M
121	863		X	-	8		-
122	868		X	-	8		-
123	876/877	X	X	58/63	7	Zwillinge	M/M
124	880		X	-	-		-
125	887		X	-	8		-
126	903		X	-	7		-
127	905	X		61	7		M
128	927	X	X	100	9		M
129	936	X	X	59	7		M
130	945/946	X	X	63	7	Zwillinge	M/M
131	951	X	X	101	9		W
132	963	X	X	63	7		M
133	964		X	-	-		-
134	965		X	-	-		-
135	967	X	X	67	6		W
136	968	X		58	8		M
137	969		X	-	9		-
138	970		X	-	-		-
139	975	X	X	69	7		M
140	980	X	X	82	8		W
141	982		X	-			-
142	985	X		92	9		M
143	990	X		97	9		M
144	997	X		35	6		M
145	999	X	X	90	8		W
146	1006	X	X	96	9		M
147	1016	X	X	59	6		M
148	1022	X	X	53	7		W
149	1034/35	X	X	72/72	8	Zwillinge	M/M
150	1038	X	X	79	8		W
151	1039	X		80	8		W
152	1041		X	-	-		-

153	1043	X	X	66	7		W
154	1066		X	-	-		-
155	1071	X		102	9		M
156	1072/73	X		50/50	7	Zwillinge	M/W
157	1077/78	X		58/61	6	Zwillinge	M/W
158	1091	X	X	69	7		M
159	1095	X	X	90	8		M
160	1100	X		61	9		W
161	1102	X	X	58	7		W
162	1105	X	X	65	7		W
163	1128/29	X	X	72/76	8	Zwillinge	M/M
164	1130/31	X	X	45/47	6	Zwillinge	M/W
165	1140/41	X	X	70/70	7	Zwillinge	W/W
166	1143	X		20	5		W
167	1144	X		73	8		W
168	1155		X	-	-		-
169	1157	X		64	5		W
170	1163	X		97	9		W
171	1164	X	X	80	8		W
172	1166		X	-	-		-
173	1171	X		78	8		M
174	1174	X	X	35	5		M
175	1197		X	-	-		-
176	1198/99	X		4/6	2	Zwillinge	k. A.
177	1200		X	-	-		-
178	3	X	X	65	7		M
179	5-7	X	X	38-43	6	Drillinge	k. A.
180	8	X		40	4		W
181	11	X		98	9		W
182	12	X		50	7		W
183	13	X		41	5		M
184	24	X		100	10		M
185	37	X	X	75	8		M
186	38		X	-	-		-
187	39		X	-	-		-
188	41	X	X	25	4		M
189	42	X	X	69	7		M
190	48/49	X	X	44/49	6	Zwillinge	M/M
191	50	X	X	63	5		W
192	60	X	X	88	9		M
193	79	X	X	81	9		M
194	86	X	X	80	9		W
195	92	X		62	7		W
196	101	X		89	7		M
197	102	X		32	6		M
198	103	X	X	42	5		M
199	111	X	X	73	7		M
200	112	X	X	58	8		M
201	113		X	-	6		-
202	117	X		51	6		W
203	118		X	-	6		-
204	119		X	-	7		-
205	120	X	X	43	6		W
206	126	X		43	5		M

207	130	X		89	9		W
208	146	X		104	9		M
209	148	X	X	20	4		k. A.
210	149	X	X	99	9		W
211	150	X		41	5		M
212	157	X		96	9		k. A.
213	159	X		45	6		W
214	170	X		69	7		W
215	191		X	-	7		-
216	192		X	-	6		-
217	193	X	X	75	8		M
218	202	X	X	70	7		W
219	207	X		89	9		M
220	208	X	X	97	9		M
221	210	X		92	9		W
222	214	X	X	67	7		W
223	220/221	X	X	60/63	6	Zwillinge	k. A.
224	227	X	X	99	9		W
225	229	X	X	94	9		W
226	243	X		12	3		W
227	246		X	-	7		-
228	247		X	-	5		-
229	248	X	X	-	9		k. A.
230	262		X	2	2		-
231	269	X	X	18	4		k. A.
232	270	X	X	34	5		W

Legende: SSL = Scheitel-Steiß-Länge,
 W = weiblich,
 M = männlich,
 k. A. = keine Angaben

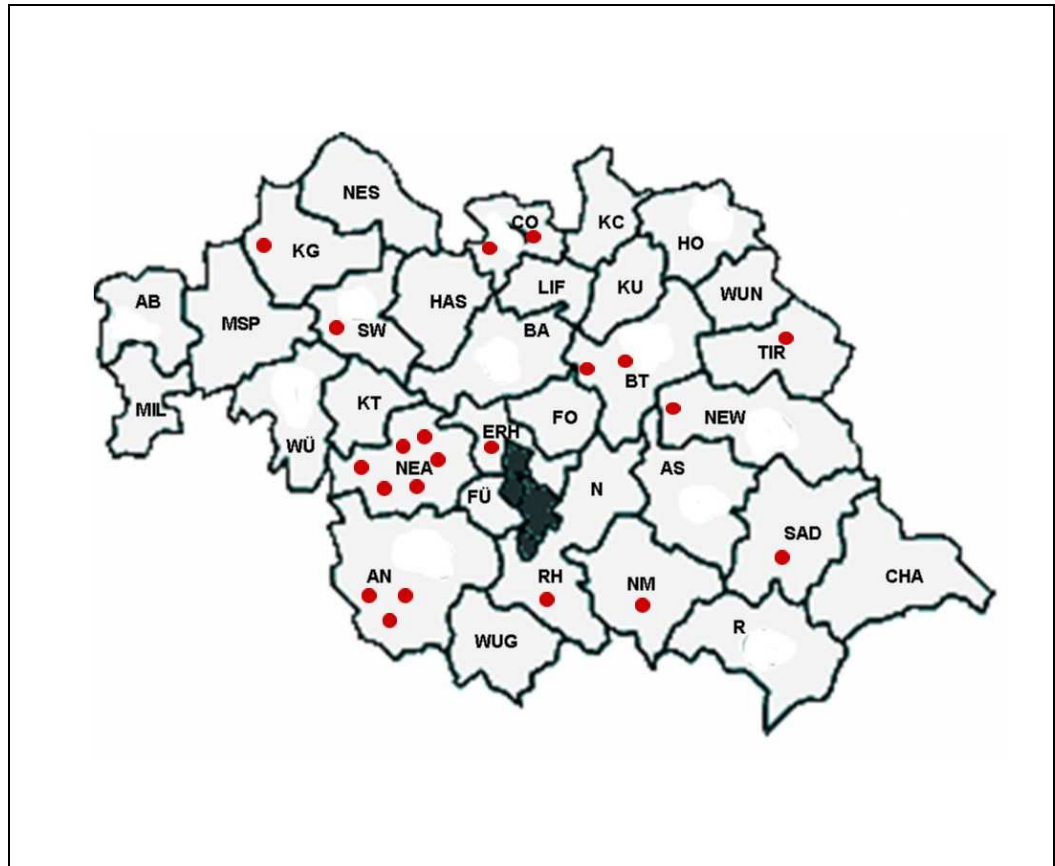


Abb. 5: Karte von Nordbayern

Tab. 3: Übersicht über die Landkreise und Häufigkeit der Aborte

Landkreis	KFZ-Kennzeichen	Anzahl der Fälle	positive Fälle
Aschaffenburg	AB	1	-
Ansbach	AN	32	3
Amberg – Sulzbach	AS	2	-
Bamberg	BA	18	-
Bayreuth	BT	9	2
Cham	CH	7	-
Coburg	CO	6	2
Donau – Ries	DON	9	-
Erlangen	ER	3	1
Erlangen Höchstadt	ERH	8	-
Forchheim	FO	2	-
Fürth	FÜ	14	-
Hassfurt	HAS	3	-
Hof	HO	4	-
Bad Kissingen	KG	6	1
Kronach	KR	2	-
Kitzingen	KT	8	-
Kulmbach	KU	1	-
Nürnberger Land	LAU	11	-
Lichtenfels	LIF	1	-
Neustadt / Aisch	NEA	34	6
Neustadt / Saale	NES	2	-
Neustadt / Waldnaab	NEW	4	1
Neumarkt	NM	10	1
Roth	RH	2	1
Schwabach	SC	1	-
Schwandorf	SAD	4	1
Schweinfurt	SW	6	1
Tirschenreuth	TIR	9	1
Weiden	WEN	1	-
Würzburg	WÜ	2	-
Weißenburg	WUG	11	-
Wunsiedel	WUN	1	-

3.2 Direkte Nachweismethoden

3.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten für die Histologie und immunhistochemischen Färbungen

Für die histologische Untersuchung wurden die Gewebeproben zunächst für mindestens 24 h in 4%iger wässriger Formaldehydlösung fixiert. Die gebrauchsfertige Lösung setzt sich zusammen aus 1 Teil mindestens 35%igem Formaldehyd, der mit 10%igen Methanol stabilisiert ist und 9 Teilen Leitungswasser hergestellt und auf die gewünschten 4% verdünnt.

Die zugeschnittenen Organproben werden in Standardeinbettkassetten verbracht und dann mit Hilfe eines Gewebeeinbettungsautomaten (Hypercenter XP, Fa. Shandon, Frankfurt) gemäß Einbettungsprotokoll entwässert.

Nach einer mindestens zweistündigen Fixierung in 4% Formalin werden die Proben eine Stunde in Leitungswasser gewässert. Anschließend erfolgt die Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe in entsprechend ansteigenden Alkoholkonzentrationen [75% Ethanol, 96% Ethanol (2x), 100% Isopropanol (3x); jedes Alkoholbad jeweils eine Stunde]. Als Zwischenmedium dienten zwei Acetonbäder, in die die Proben für jeweils eine Stunde eingebracht wurden. Anschließend wurden sie für 1½ und zwei Stunden in Paraplast (Histowax®) überführt und daraufhin in Metallförmchen ausgegossen. Aus den fertigen Paraffinblöcken werden ca. 2-3 µm dicke Schnitte auf einem Rotationsmikrotom (RM 2155, Fa. LEICA, Nussloch) hergestellt. Die Schnitte wurden dann in einem 45°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden sie in einem Trockenautomaten (Trockenschrank 2754, Fa. Medite, Burgdorf) für mindestens 20 Minuten bei 60-65°C getrocknet.

Anschließend erfolgt eine Hämalaun-Eosin (H.E.-) Färbung in einem Färbeautomaten (Varistain 24-4, Fa. Shandon, Frankfurt). Das Eindecken der Schnitte erfolgt ebenfalls automatisch (Eindeckautomat RCM 60/90, Fa. Medite, Burgdorf). Die Beurteilung der Schnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop Dialux 20 EB der Firma Leitz (Wetzlar).

Sonderbehandlung der Schnitte bei weiterer Verwendung für die Immunhistologie:

Für immunhistologische Untersuchungen wurden die 2µm dicke Schnitte auf speziell beschichtete Objektträger (SuperFrostPlus, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Die Schnitte wurden zunächst über Nacht an der Luft und am nächsten Morgen zusätzlich für zwei Stunden bei 70°C in einen Trockenautomaten (Trockenschrank 2754, Fa. Medite, Burgdorf) getrocknet.

3.2.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Die Immunhistologie erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von PETERS (1999). Die an Geweben von Hunden erprobte ABC-Methode ermöglicht die Darstellung verschiedener Parasitenstadien von *Neospora caninum* im Gewebeschnitt. Die Methode wurde (leicht) modifiziert, so dass eine routinemäßige Anwendung in dem am LGL vorhandenen Ventana-Immunhistologieautomaten möglich war. Als Färbemethode kam die in Kapitel 2.3.1.2 beschriebene LAB/LSAB-Methode zum Einsatz. Es kam der kommerziell erhältliche Enhanced Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Fa. Ventana, Illkirch, Frankreich) zum Einsatz.

Bei jedem immunhistochemischen Untersuchungslauf wurden neben den zu untersuchenden Feldproben stets eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente ein Gehirnschnitt eines jungen Hundes mit *Neospora caninum*-bedingter Enzephalitis, das uns freundlicherweise von Dr. Martin Peters, Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg, zur Verfügung gestellt wurde. Im histologischen Schnitt des Hundegehirnes waren bereits in der Übersichtsfärbung (H. E.) zahlreiche Parasitenzysten zu erkennen. Als Negativkontrollen dienten histologische Schnitte vom Gehirn eines Rindes, das serologisch negativ auf *Neospora caninum*-Antikörper getestet worden war. Desweiteren wurden Schnitte des oben genannten Hundegehirnes mit einer *Neospora caninum*-bedingten Enzephalitis mitgeführt, die in diesem Falle mit Verdünnungsmedium anstelle von *Neospora caninum*-Antiserum inkubiert wurden.

Die getrockneten Objektträger werden mit einem dem Färbeprotokoll zugeordneten Barcodelabel versehen auf das die jeweilige Untersuchungsnummer gedruckt wird.

Die Rehydratisierung der Schnitte erfolgte per Hand in einer absteigenden Alkoholreihe:

Tab. 4: Protokoll der Rehydratisierung

REAGENZ	DAUER
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Isopropanol (100%)	3 min
Isopropanol (100%)	3 min
Ethanol (96%)	3 min
Ethanol (70%)	3 min
Aqua destillata	kurzes Schwenken
APK-Waschpuffer*	kurzes Schwenken

*APK-Waschpuffer: kommerzielle Pufferlösung der Fa. Ventana, speziell zur Verwendung mit dem IHC- Färbeautomaten

Während sich die Proben in der absteigenden Alkoholreihe befanden, wurde das Gerät vorgeheizt und mit dem Reagenzienkarussell bestückt. Die nun rehydrierten Schnitte wurden in das Gerät eingelegt und sofort mit APK- Waschpuffer benetzt, um eine Austrocknung zu verhindern.

Um die Bindung der Antikörper an die Gewebsantigene zu optimieren, wurde dieses enzymatisch anverdaut. Hierzu wurde Protease 1, eine Endopeptidase, die Bestandteil des Testkits ist, verwendet und für 16 Minuten bei 37°C inkubiert.

Um unspezifische Bindungen zwischen dem Primärantikörper und diversen Antigenen im Gewebe weitgehend zu unterbinden, erfolgte zunächst eine Inkubation der Gewebeproben mit Ziegen-Normalserum (Fa. Sigma, Taufkirchen). Das Ziegen-Normalserum wurden für diesen Zweck unmittelbar vor dem Gebrauch mit einem Verdünnungsmedium (Antibody Diluent, Fa. Ventana) im Verhältnis 1: 5 verdünnt und in einen zusätzlich angebrachten Spender des Automaten gefüllt. Die Inkubationszeit des Serums betrug 20 Minuten.

Zur Unterbindung unspezifischer Färbungen wurde ein Blocking Kit in einigen Läufen ausgetestet. Der Blocking Kit unterdrückt unspezifische Hintergrundfärbungen, die durch endogenes Biotin in Zellen und Geweben hervorgerufen werden. Der Blocker A des Kits bindet spezifisch an das im Gewebe vorhandene Biotin, der Blocker B sättigt die verbleibenden Bindungsstellen des Eiweiß-Avidins in Blocker A und reduziert so die nichtspezifische Färbung.

Als Primärantikörper diente das (polyklonale) Antiserum Kaninchen-anti-*Neospora caninum*. Der polyklonale Antikörper wurde von Dr. Gereon Schares am Friedrich-Löffler-Institut in Wusterhausen entwickelt und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Er wurde in den Verdünnungsstufen 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900 und 1:1000 getestet. Desweiteren wurden verschiedene Inkubationszeiten des Primärantikörpers erprobt. Zunächst wurden Läufe mit 20 Min Inkubationszeit durchgeführt und später mit 32 Minuten in der Routineuntersuchung. Die Inkubationstemperatur betrug dabei jeweils 37°C.

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Antikörper aus der Ziege verwendet, der sowohl mit Maus- als auch mit Kaninchenimmunglobulinen reagiert. Im positiven Falle bindet der biotinylierte Sekundärantikörper an das Streptavidin-konjugierte Enzym Alkalische Phosphatase. Das Enzym bildet mit Naphthol und dem Fast Red Chromogen einen roten Farbniederschlag.

Der biotinylierte Sekundärantikörper, das Enzym und die weiteren Reagenzien, die für die Entstehung der Farbreaktion notwendig sind, sind allesamt Bestandteil des Ventana-Färbekitsystems.

Der Enhanced Alkaline Phosphatase Red Detection Kit der Fa. Ventana enthält folgende Komponenten:

Enhanced Fast Red A, Enhanced Fast Red B, Enhanced Naphtol, Enhanced Streptavidin Alkaline Phosphatase, Enhanced Enhancer und Enhanced Biotinylated Immunglobulines.

Die jeweiligen Inkubationszeiten wurden mit Hilfe einer zum Gerät gehörenden Software programmiert. Die Inkubationstemperatur war bereits vorgegeben und betrug 37°C. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsschritte wurden die Schnitte im Automaten gespült, um ungebundene Chemikalien zu entfernen. Außerdem wurde Liquid Coverslip, ein n-paraffinhaltiger Kohlenwasserstoff und ebenfalls ein Bestandteil des kommerziellen Kits, aufgetragen, um die Verdunstung der wasserhaltigen Reagenzien zu verhindern.

Das genaue Färbeprotokoll des Ventana-Immunhistologieautomaten für den Nachweis von *Neospora caninum* ist im Folgenden der Übersicht halber tabellarisch dargestellt:

Tab. 5: Protokoll des immunohistochemischen Färbeprotokolls

Protokollschritt	Dauer der Inkubation
Aufwärmen des Waschpuffers auf 41.0°C	
Spülen der Objektträger	
Auftragen des Coverslip	
Aufwärmen des Waschpuffers auf 37.0°C	
Spülen der Objektträger	
Auftragen des Coverslip	
Inkubation mit Protease 1	16 Min
Spülen der Objektträger	
Auftragen des Coverslip	
Auftragen von 1 Tropfen Ziegen-Normalserum	20 Min
Spülen der Objektträger	
Auftragen des Coverslip	
Inkubation mit Kaninchen-Anti- <i>Neospora caninum</i> -Antikörper (1:100 mit Zusatz von 20% Ziegennormalserum)	32 Min
Spülen der Objektträger	
Auftragen des Coverslip	
Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper	8 Min
Spülen der Objektträger	
Auftragen des Coverslip	
Auftragen von 1 Tropfen Streptavidin-alkalische Phosphatase	12 Min
Spülen der Objektträger	
Auftragen des Coverslip	
Auftragen von 1 Tropfen des Verstärkers	4 Min
Auftragen von 1 Tropfen FAST RED A und 1 Tropfen NAPHTOL	8 Min
Auftragen von 1 Tropfen FAST RED B	8 Min
Spülen der Objektträger	
Auftragen des Coverslip	
Auftragen von 1 Tropfen HEMATOXYLIN	4 Min
Spülen der Objektträger	
Auftragen des Coverslip	
Auftragen von 1 Tropfen BLUING REAGENT	2 Min
Spülen der Objektträger	

Legende:

COVERSLIP: n-paraffinhaltiger Kohlenwasserstoff zur Vermeidung von Evaporation

PROTEASE: Endopeptidase zur Spaltung der Gewebeproben

ENH BIOT Ig/VR: Biotinylierter IG Sekundärantikörper; enthält affinitätsgereinigtes Ziegen-anti-Maus IgG und IgM (<200µg/ml), und Ziegen-anti-Kaninchen IgG (<200µg/ml)

ENH SA-AP/VR: Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase

ENH ENHANCER/VR: Reagenz zum Verstärken (to enhance=verstärken) der Reaktion

ENH FAST RED A: rotes Chromogen

ENH NAPHTOL: ein Reagenz zum Oxidase-Nachweis

ENH FAST RED B: blaues Chromogen

HEMATOXYLIN: Farbstoff zum Gegenfärben

BLUING REAGENT: Farbstoff zum Nach-Gegenfärben

Nach Ablauf des Programms wurden die Proben kurz in lauwarmem Seifenwasser gespült und anschließend per Hand in einer aufsteigenden Alkoholreihe wie folgt entwässert:

Tab. 6: Protokoll der Dehydratisierung

REAGENZ	DAUER
Ethanol (70%)	kurzes Schwenken
Ethanol (96%)	2 min
Isopropanol (100%)	2 min
Isopropanol (100%)	2 min
Xylol	2 min
Xylol	10 min

Nach dem Xylol-Bad erfolgte die Eindeckung der Objektträger mit Hilfe eines Eindeckautomaten (RCM 60/90, Fa. Medite, Burgdorf), anschließend die lichtmikroskopische Beurteilung.

3.2.3 PCR

Um die molekularbiologischen Untersuchungen durchführen zu können, wurden die Proben zunächst homogenisiert und die Nukleinsäuren extrahiert. Anschließend wurden verschiedene PCR Untersuchungsmethoden durchgeführt, um die in den Proben enthaltene *Neospora*-DNA nachzuweisen.

Dabei wurde ein der jeweiligen Methode *Neospora caninum* spezifisches DNA-Fragment amplifiziert. Je nach Methode konnte das Fragment entweder sofort über Fluoreszenzsignale oder über eine anschließende Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid detektiert werden.

Bei jeder Reaktion wurden neben einer NTC (= No Template Control)-Probe, auch positive und negative Feldprobenkontrollen sowie ein Klon-Standard mitgeführt, den uns das Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) durch Herrn Dr. Gereon Schares mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung stellte.

3.2.3.1 Homogenisieren

Um, wie bereits im Literaturteil beschrieben, eine gleichmäßige Erregerverteilung und damit eine höhere Trefferquote zu erzielen wurden die Proben (Gehirn und Plazenta) zunächst aufgetaut, mit einem PBS (Phosphate Buffered Saline, 0,15 M)-Puffer im Verhältnis 1:1 versetzt und anschließend mechanisch homogenisiert (Mixstab Ultra-Turrax T25, Fa. Janke-Kunkel). Das gewonnene Homogenisat wurde in mehrere Aliquote zu je 50µl aufgeteilt und erneut bei -80°C gelagert.

3.2.3.2 Extraktion

Eine weitere Vorbereitung zur PCR war die Gewinnung, Isolation und Reinigung der Nukleinsäuren aus den Organproben.

Bei der Extraktion liefen eine positive und negative Feldprobe (Fall 980 und Fall 420, jeweils Gehirngewebe) und eine zusätzliche Wasser-Leerprobe als Kontrolle mit. Die Proben waren zuvor durch andere Methoden (Serologie, Histologie, Immunhistologie) getestet worden. Mit dem Einsatz der Wasser-Leerprobe und Negativkontrolle können der Erfolg der Extraktion und eventuelle Verschleppungen/Kontaminationen überprüft werden.

Die Extraktion wurde mit dem kommerziell-erhältlichen High Pure PCR Template Preparation Kit der Fa. Roche (Penzberg) durchgeführt.

Alle im Folgenden genannten Reagenzien und Gefäße (Tissue Lysis Buffer, Proteinase K, Binding Buffer, Inhibitor Removal Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, High Pure Filter Tubes, Collection Tubes)

waren bereits in dem Kit enthalten.

Die genaue Vorgehensweise ist schrittweise im folgenden Text und Flussdiagramm dargestellt:

Die in Eppendorf-Reaktionsgefäßen eingefrorenen, homogenisierten Gewebeproben von jeweils 50 µl wurden zunächst mit 200µl Lysispuffer und 40µl Proteinase K versetzt und für 1 Stunde bei 55°C inkubiert, um das Gewebe zu lösen. Dazu wurden die Proben in einen Thermomixer Comfort der Firma Eppendorf (Hamburg) verbracht.

Nach dieser Inkubationszeit wurde 200µl Binding Buffer zugegeben und erneut bei 72°C für 10 Minuten in einem weiteren Thermomixer inkubiert.

Das im Lysispuffer und Bindingpuffer enthaltene chaotrope Salz inaktiviert sämtliche in der Probe vorhandenen Nukleasen und schafft günstige Voraussetzungen für die Bindung der DNA an die Silicia-Gelmembran.

Anschließend erfolgte eine Zugabe von 100µl Isopropanol, wodurch die Proteine aus der Probe ausgefällt werden.

Nach gründlichem Mischen und Zentrifugieren (1 Min./8000U) wurden 500µl in spezielle, endonucleasefreie Filter-Tubes überpipettiert.

Nach erneutem Zentrifugieren (1 Min./8000U) wurden der Puffer und das Auffanggefäß verworfen.

Als nächster Schritt erfolgte die Zugabe von 500µl Inhibitor Buffer.

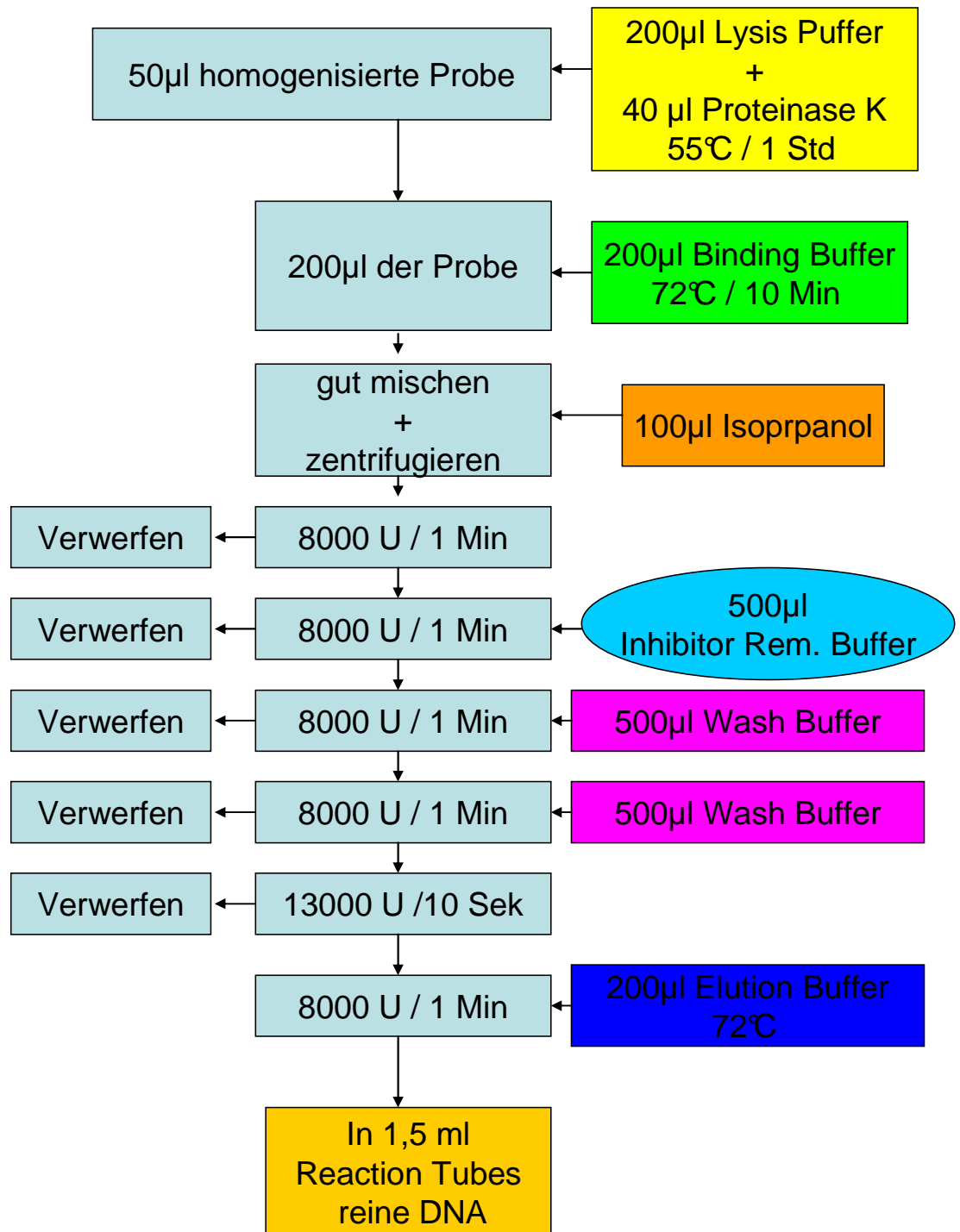
Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1Min./8000U) wurden 2 Wash-Buffer Schritte durchgeführt und ebenfalls wieder zentrifugiert (1Min./8000U) und verworfen. Aufgabe des Inhibitorpuffers und des Waschpuffers ist es die noch vorhandenen Inhibitoren aus der Probe zu entfernen.

Durch einen maximalen Zentrifugationslauf (10Sek/13000U) wurden die letzten Flüssigkeitsanteile entfernt.

Zum Abschluß gab man 200µl auf 70°C angewärmten Elutionspuffer auf die Filter und zentrifugierte erneut (1Min./8000U), wodurch die DNA vom Filter gelöst und in ein 1,5ml Reaction Tube überführt wurde.

Um mit diesem Eluat weitere Untersuchungen durchführen zu können wurden Aliquote zu jeweils 50µl angelegt und bei -80°C tiefgefroren.

Abb. 6: Flussdiagramm der Arbeitsschritte



Um die Konzentration und Reinheit der extrahierten DNA zu bestimmen wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers stichprobenartig eine photometrische Messung der Proben vorgenommen. Die gemessene Absorption (A) bei 260nm ist der in der Probe vorhandenen DNA Menge direkt proportional. Um eine möglichst genaue Messung zu erhalten sollte dieser Wert zwischen 0,1 und 1 liegen.

Ein A (Absorption) 260=OD (optische Dichte) 260 = 1 entspricht etwa 50µg/ml dsDNA (doppelsträngige DNA). Daraus lässt sich folgende Beziehung ableiten:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 (\mu\text{g/ml}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um eine Aussage über die Reinheit der DNA machen zu können, wurde zusätzlich eine Messung bei 280nm durchgeführt. Da 260nm das Absorptionsmaximum von DNA und 280 nm das Absorptionsmaximum für Proteine darstellt, lässt das Verhältnis A_{260}/A_{280} eine Aussage über die Verunreinigung der DNA mit Proteinen zu. Reine DNA hat ein Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von 1,7-1,9.

3.2.3.2 Konventionelle PCR

Um Amplifikationen unerwünschter DNA-Abschnitte zu vermeiden, wurden sehr spezifische Primerpaare ausgewählt und bezüglich ihrer Spezifität im Nc1-Blast (Basic Local Alignment Search Tool, eine weltweite Sammlung biologischer Sequenzdaten) überprüft. Zielbereich war der Nc-5 Abschnitt auf dem *Neospora caninum* Genom. Die ausgesuchten Primer sollten nach Möglichkeit nur an die entsprechenden *Neospora caninum* Fragmente binden, am 5' Ende mit CC beginnen und ein relativ kleines Molekulargewicht aufweisen.

Diese Anforderungen erfüllten die Primer, die sowohl MÜLLER et al. (1996, 2002) als auch PETERS et al. (2000) beschrieben haben. Die Original Forwardprimer wiesen entweder ein –AC (MÜLLER et al., 1996, 2002) oder ein -AT- Ende (PETERS et al., 2000) auf.

Tab. 7: Forward Primer

Name	Basenfolge	Amplifikatlänge (bp)	Autor
Np21plus	5'> CCC AGT GCG TCC AAT CCT GTA A <3'	327	Modifikation nach Grossmann, (pers. Mitteilung 2006)
Np21plusC	5'> CCC AGT GCG TCC AAT CCT GTA AC <3'	328	Müller et al. (1996, 2002)
NP21plusT	5'> CCC AGT GCG TCC AAT CCT GTA AT <3'	328	Peters et al. (2000)

Legende:

Np	=	Neospora caninum Primer
A	=	Adenin
C	=	Cytosin
G	=	Guanin
T	=	Thymin

Im CVUA (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt) Karlsruhe, Außenstelle Heidelberg, wird eine modifizierte Sequenz dieser Primer verwendet. Der eingesetzte Forwardprimer hatte ein um eine Position gekürztes A-Ende (GROSSMANN, persönliche Mitteilung 2006). Der Reverse Primer war hingegen in allen Literaturangaben konstant und wurde so übernommen:

Tab. 8: Reverse Primer

Name	Sequenz	Konzentration	Amplifikatlänge (bp)
<i>Neospora caninum</i>	F:5'>CCC AGT GCG TCC AAT CCT GTA A<3'	100µM	327
<i>Neospora caninum</i>	R:5'>CTC GCC AGT CAA CCT ACG TCT TCT<3'	100µM	327

Legende:

Np	=	Neospora caninum Primer
A	=	Adenin
C	=	Cytosin
G	=	Guanin
T	=	Thymin

Ein Standardansatz bestand aus den zu untersuchenden Feldproben, negativen und positiven Feldkontrollen, der NTC (No Template Control, Wasser-Leerprobe) sowie einem Klon-Standard.

Der 20µl-Ansatz wurde mit dem HotStarTaq Master Mix Kit der Firma QIAGEN (Hilden) angesetzt und bestand aus folgenden Komponenten:

Tab. 9: 20µl-Ansatz der konventionellen PCR

Substanz	Volumen (µl)	Konzentration
Aqua dest.	11,8	-
10x Puffer	2	-
dNTP	0,8	10mM
Primer A	0,1	100µM
Primer B	0,1	100µM
Taq DNA-Polymerase	0,2	5U/µl
Probe	5	-

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Tpersonal, Fa. BIOMETRA, Göttingen).

Es lagen folgende Temperatur- und Zyklenprofile vor:

Tab. 10: Ansatz mit 35 Zyklen:

Zeit	Temperatur in °C	Anzahl der Wiederholung
15 Min	95	
30 Sek	94	
30 Sek	62	
40 Sek	72	
		5x
30 Sek	93	
30 Sek	62	
40 Sek	72	
		30x
5 Min	72	
Pause	10	

Tab. 11: Ansatz mit 45 Zyklen:

Zeit	Temperatur in °C	Anzahl der Wiederholung
15 Min	95	
30 Sek	94	
30 Sek	62	
40 Sek	72	
		5x
30 Sek	93	
30 Sek	62	
40 Sek	72	
		40x
5 Min	72	
Pause	10	

Bei dieser Methode wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. So fanden Versuche mit unterschiedlichen Verdünnungsreihen (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) des Klons statt.

Weiterhin wurden wie oben beschrieben auch verschiedene Zyklenanzahlen erprobt, unter anderem Läufe mit 35 und 45 Zyklen.

Auch wurde mit verschiedenen Volumina des Ansatzes experimentiert (20 µl und 50 µl). Die Erhöhung des Volumens des Mastermixes sollte bessere Reaktionsbedingungen schaffen, da die einzelnen Moleküle so mehr sterischen Raum zur Reaktion erhalten.

Ferner wurden auch die Feldproben in verschiedenen Volumina eingesetzt (Normvolumina, doppelte Probenmenge). Der Gedanke dabei war durch die Volumenerhöhung der Probe auch eine höhere Erreger-DNA-Ausbeute zu erzielen. Die Tabelle 12 zeigt die Testansätze.

Tab. 12: Testansätze mit verschiedenen Volumina

Volumen Mastermix	Volumen Probenmenge
20µl (18µl Mastermix+2µl Probe)	Normvolumina analog Literatur
20µl (16µl Mastermix+ 4µl Probe)	Doppelte Menge im Experiment
50µl (45µl Mastermix + 5µl Probe)	Normvolumina analog Literatur
50µl (40µl Mastermix + 10µl Probe)	Doppelte Menge im Experiment

Desweiteren wurden auch unterschiedliche Zusammensetzungen des PCR- Mastermixes ausgetestet. Es kam so zum Einsatz von der von der Firma QIAGEN (Hilden) erhältlichen Q-Solution, ein Reagenz, das die Reaktion der PCR stabilisieren soll. Sie wurde laut Angaben des Herstellers in 1- und 5- facher Konzentration eingesetzt und ausgetestet. Letztendlich wurden auch zwei Chargen an Primern von unterschiedlichen Herstellern eingesetzt.

Im Anschluß an die PCR fand die Agarosegel- Elektrophorese statt.

Zur gelelektrophoresischen Auftrennung wurde ein 1,75%iges Agarosegel verwendet.

2,63g SeaKem (LE-Agarose, Fa. Cambrex Bioscience Rockland, Inc., USA) wurden mit 150 ml TBE-Puffer (10x Tris/Boric acid/EDTA-Buffer, Fa. BIORAD, München) vermengt und unter Aufkochen in der Mikrowelle (R-334, Fa. Sharp) für 4 Minuten gelöst.

Zwischenzeitlich wurde eine Gelform mit passenden Kämmen für die Entstehung der gewünschten Taschen versehen und anschließend mit der Lösung gefüllt.

Nach Erstarren des Gels, wurden die Kämmen entfernt und man überführte das Gel in eine Elektrophoresewanne (Sub-Cell GT, Fa. BIORAD, München) die mit TBE Puffer gefüllt war. Die Flüssigkeit bedeckte dabei das Gel vollkommen.

Anschließend wurden jeweils 8µl der Feldproben mit 2µl Ladepuffer (Nucleic Acid, Sample Loading Buffer (5x), Fa. BIORAD, München) versetzt und in die Kavitäten des Gels pipettiert.

Als Längenmarker verwendete man 6 µl je Tasche einer DNA-Leiter (Peglab, Fa. Biotechnologie GmbH, Erlangen), die aus einer 50/100 bp DNA-Leiter und einem Ladepuffer (6x) zusammengesetzt ist.

Die gelelektrophoresische Auftrennung erfolgte über eine Dauer von 100 Min bei einer Spannung von 100 Volt und 400mA.

Nach der Elektrophorese kam das Gel für 30 Min in eine mit 50µl Ethidiumbromid (Ethidium Bromide Solution 10mg/ml, Fa. BIORAD, München) und 1000ml Aqua bidest-gefüllte Wanne zum Färben. Das gewünschte DNA-Fragment konnte nun durch das eingelagerte fluoreszierende Ethidiumbromid, das doppelsträngige DNA unspezifisch anfärbt, mit UV-Licht auf einem UV-Transilluminator (Universal HoodII, Fa. BIORAD, München) als Bande sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe einer CCD (Charge Coupled Device, lichtempfindlicher Halbleiterdetektor)- Kamera konnten die Gele für Dokumentationszwecke aufgenommen und die Bilder über einen Printer ausgedruckt werden.

3.2.3.3 Real Time PCR: SYBR Green

Die Untersuchungen fanden in Anlehnung an die Arbeit von COLLANTES-FERNANDEZ und Mitarbeitern (2002) statt.

Es sollte die *Neospora caninum* spezifische Nc-5 Genomsequenz (GenBank accession no. X84238) nachgewiesen werden (KAUFMANN et al., 1996).

Dazu wurden Primer ausgesucht, die ein 76 Basenpaar-langes DNA-Fragment amplifizieren. Der *N.caninum* Nc5 forward Primer umfasst dabei die Nukleotide 248-257 und der *N. caninum* reverse Primer die Nukleotide 303 bis 323.

Die in der spanischen Arbeit angegebenen Primer wurden übernommen:

Tab. 13: Primer aus der spanischen Literatur

Spezies	Sequenz	Konzentration	Amplifikatlänge (bp)
<i>Neospora caninum</i>	F:5'>ACT GGA GGC ACG CTG AAC AC<3'	100 pmol/μl	76
<i>Neospora caninum</i>	R:5'>AAC AAT GCT TCG CAA GAG GAA<3'	100 pmol/μl	76

Die Nukleinsäureisolierung (DNA-Extraktion) aus dem homogenisierten Gewebe fand wie bereits zuvor beschrieben mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) statt.

Aufgrund labortechnischer Gegebenheiten (Geräte, Testkits, Produktgebundenheit) musste das beschriebene Protokoll und Vorgehen modifiziert werden.

So kam der QIAGEN QuantiTECT™ SYBR®Green PCR Kit zum Einsatz. Der Kit enthielt dabei den Mastermix und das DNA- und RNase freie Wasser.

Der Mastermix selbst bestand aus der HotStarTaq® DNA Polymerase, dem QuantiTect SYBR Green PCR Buffer, dNTP, SYBR Green I, 5mM MgCl₂.

Zusätzlich mussten noch die Primer, FITC und die Probe hinzugefügt werden.

Tab. 14: PCR- Ansatz mit 25µl Reaktionsvolumen

Substanz	Volumen(µl)	Konzentration
2x Master Mix	12,5 µl	1x
Primer A	0,2 µl	800nM
Primer B	0,2 µl	800nM
FITC	2,5 µl	50nM
RNA-/DNase freies Wasser	4,6 µl	-
Probe	5 µl	(1pg bis 2µg)

Legende:

FITC= Fluorescein-5-isothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff für die Markierung von Proteinen

Ein Ansatz bestand aus den zu untersuchenden Feldproben, einer Positiv- und Negativkontrolle aus Feldproben, der NTC (No Template Control, Wasser-Leerprobe) und dem Klon-Standard (10^6 , 10^4 , 10^2 , 10^0). Die Positiv- und Negativproben waren durch andere Untersuchungsmethoden (Histologie, Immunhistologie, Serologie) bestätigt worden.

Die PCR wurde in einem Thermocycler (iCycler IQ, Fa. BIORAD, USA) durchgeführt.

Das Temperaturprofil wurde wie folgt gewählt:

Tab. 15: Temperaturprofil

Aktivierung der Polymerase	15 Min	95 °C	1x
Denaturierung	20 Sek	94 °C	40x
Annealing	1 Min	60 °C	40x
Schmelzpunktanalyse	10 Sek	60 -95°C in 0,5°C Schritten	70x
Entnahme		15 °C	

Mit verschiedenen Testansätzen und Änderungen diverser Parameter wurde versucht sich den Werten und Ergebnissen aus Spanien zu nähern.

Es wurde verschiedene Änderungen im PCR-Ansatz oder im Temperaturprofil getestet.

So fanden Versuche mit unterschiedlichen Verdünnungsreihen (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) des Klons statt. Ziel war es, die hausinterne Nachweisgrenze herausfinden.

Es wurden auch verschiedene Temperaturgradienten ausgetestet, um eine höhere Sensitivität zu erzielen. So wurden Primer-Annealing-Temperaturen in einem Testlauf von 45,2°C, 46,3°C, 48,2°C, 50,9°C, 54,7°C, 57,4°C, 59,2°C und 60,2°C ausgewählt und miteinander verglichen. In einem anderen Testansatz 40,0°C, 41,2°C, 43,1°C, 45,8°C, 49,6°C, 52,3°C, 54,0°C und 55°C.

Weiterhin wurden auch verschiedene Zyklenanzahlen erprobt, unter anderem Läufe mit 30, 35, 40, 45, 50 und 55 Zyklen, um auch noch schwach-positive Proben zu erfassen, die erst zu einem späten Ct (Cycle Threshold)-Wert detektierbar waren.

Eine weitere Versuchsanordnung war der Einsatz unterschiedlicher Primerkonzentrationen (z.B. 100nM, 200nM usw.), um die letztendlich Gebrauchskonzentration festzustellen. Auch wurde mit verschiedenen Volumina des Ansatzes experimentiert (20µl, 25µl, 50µl, 100µl). Durch die Volumenerhöhung sollten bessere Reaktionsbedingungen geschaffen werden, damit die einzelnen Moleküle mehr sterischen Raum zur Reaktion erhalten.

Ferner wurden auch die Feldroben in verschiedenen Stufen verdünnt (unverdünnt, 1:1, 1:10, 1:100), um eine Hemmung der Reaktion durch zu viel Nukleinsäure oder durch inhibierende Substanzen im Eluat auszuschließen. In anderen Ansätzen wurde die doppelte Menge hinzugegeben, um eventuell eine höhere Erreger-DNA-Ausbeute zu erzielen.

3.2.3.5 Real Time PCR: TaqMan Sondentechnik

Diese Untersuchungsmethode wurde mit Primern und Sonden durchgeführt, die von Dr. Großmann, CVUA Karlsruhe, Außenstelle Heidelberg, entwickelt wurden (Publikation in Vorbereitung). Der Reporter-Farbstoff ist FAM (6-Carboxy-Fluoreszin), der Quencher Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetra-Methyl-Rhodamin).

Ein Standardansatz bestand aus den zu untersuchenden Feldproben, Negativ- und Positivkontrollen sowie einem Klon-Standard.

Der 25µl-Ansatz wurde mit dem HotStarTaq Master Mix Kit der Firma QIAGEN (Hilden) angesetzt und bestand aus folgenden Komponenten:

Tab. 16: Komponenten des 25µl Ansatzes:

Substanz	Volumen (µl)	Finale Konzentration
Aqua dest.	12,975	-
10x PCR Puffer	2,50	1x
dNTPs	0,5	je 200µM von jedem dNTP
MgCl ₂	3,25	1,5 mM
Primer A	0,2	800 nM
Primer B	0,2	800 nM
Sonde	0,25	100 nM
Taq DNA-Polymerase	0,125	2,5 Units
Probe	5	-

Legende: dNTP= Nukleotidmix aus je 10mM an dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Die Sondentechnik wurde auf einem Thermocycler (MX 3000 P, Fa. Stratagene, Niederlande) und der dazugehörigen Computeranlage durchgeführt.

Das 3step-Thermoprofil wurde wie folgt gewählt:

Tab. 17: Temperaturprofil:

Aktivierung	15 Min	95 °C	1x
Denaturierung	30 sec	94 °C	40x
Annealing	30 sec	60 °C	40x
Elongation	30 sec	72 °C	40x

Nach Abschluß des Programms konnten die Werte direkt abgelesen werden.

3.3 Indirekte Nachweismethoden

3.3.1 ELISA

Für die Untersuchung der Blut- und Körperfluidproben am LGL wird ein kommerzieller Testkit zum Nachweis von *Neospora caninum* Antikörper verwendet (HerdChek *Neospora caninum* Antibody Test Kit von IDEXX Laboratories, Inc., USA).

Es handelt sich um ein ELISA (EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay)- Testsystem, das eine Ergänzung zu den anderen Diagnostikmethoden darstellt. Das Testprinzip beruht auf dem Nachweis von Antikörpern gegen *Neospora caninum* in den zu untersuchenden Flüssigkeiten.

Das System besteht aus einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten, die vom Hersteller mit *Neospora* Antigen beschichtet wurden. Während der Inkubation der Proben in den Vertiefungen der Platte bilden die Antikörper mit dem Antigen auf dem Plattenboden einen Immunkomplex.

Nach dem Auswaschen von ungebundenem Material wird ein Anti-Rind-Konjugat (Meerrettichperoxidase) hinzugefügt, das sich an die vorhandenen *Neospora caninum*- Rinder- Antikörper festsetzt.

Im letzten Schritt des Tests wird das nicht gebundene Konjugat in einem Waschschrift entfernt und ein Enzymsubstrat (Wasserstoffperoxid) und ein Chromogen (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin) in die Vertiefung gegeben. Die eintretende Farbreaktion ist proportional zu der Menge an Antikörpern in der Probe. Mit einem Photometer können die Extinktionswerte bei 620nm, 630nm oder 650nm gemessen und die Ergebnisse berechnet werden. Ein ELISA misst also die optische Dichte und die prozentuale Änderung zur Positivkontrolle.

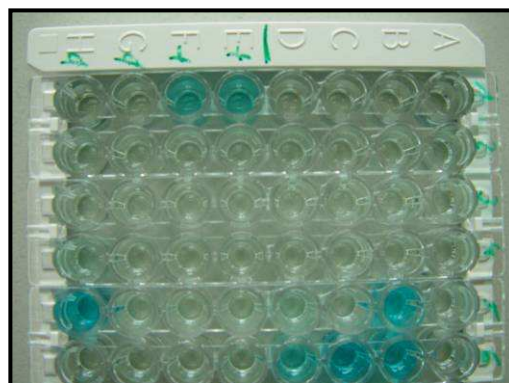


Abb. 7: Beispiel einer Mikrotiterplatte, bei der in 7 Kavitäten ein Farbumschlag stattgefunden hat

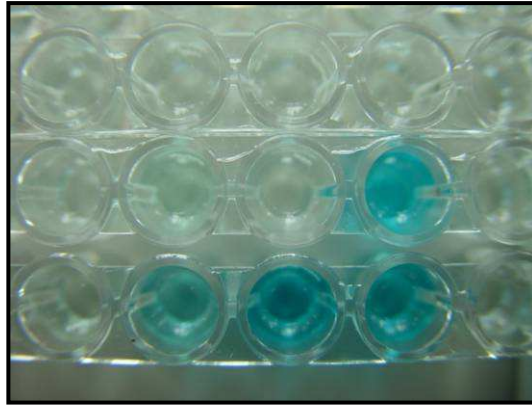


Abb. 8: Vergrößerung einer Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Nuancen im Farbumschlag

Neben den Feldproben werden auch immer eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle (P) dient ein Rinderserum, das positiv auf Neospora reagiert.

Die Positivkontrolle ist standardisiert und enthält eine messbare Menge an Antikörpern gegen Neospora in Rinderserum.

Als Negativkontrolle (N) kommt ebenfalls ein Rinderserum zum Einsatz, das jedoch nicht auf Neospora reagiert. Beide Kontrollen sind im Kit enthalten und sind in Phosphat/puffer mit Proteinstabilisatoren gelöst. Die Konservierung erfolgt mit Natriumazid.

Damit der Test gültig ist, muss die Differenz (P-N) zwischen dem Mittelwert der positiven Kontrolle und dem Mittelwert der negativen Kontrolle größer oder gleich 0,150 sein.

Zusätzlich muss der Mittelwert der Negativkontrolle kleiner oder gleich 0,20 sein.

Die Feldproben werden zum Mittelwert der Positivkontrollen ins Verhältnis gesetzt. Die Ermittlung dieses Verhältnis von Feldprobe zu Positivkontrolle (P:PK) klärt das Vorhandensein oder Fehlen von Neospora Antikörpern.

Die Cut-Off Werte liegen wie folgt:

P:PK	unter 0,50	NEGATIV
P:PK	größer oder gleich 0,50	POSITIV

Es ist jedoch zu erwähnen, dass der Test für Plasma und Seren zugelassen und validiert ist, nicht für Körperfluidproben. Die Cut-Off Grenzen für Plasma und Seren wurden für Körperfluide übernommen ohne weitere Validierung.

Neben dem hausinternen ELISA-Test am LGL wird zusätzlich am Friedrich Löffler Institut (FLI) unter der Leitung von Herrn Dr. Schares ein weiterer ELISA und ein Western Blotting durchgeführt. Da ich diese Arbeiten nicht selbst getätigt habe, möchte ich hier nur kurz die jeweiligen Verfahren beschreiben:

3.3.2 ELISA p38

Zur Anwendung in Wusterhausen kommt ein von Herrn Dr. Schares entwickelter ELISA mit höherer Spezifität zum Nachweis des p38 Oberflächenantigens von Tachyzoiten des *Neospora caninum* NC-1 Stamms.

Diese hohe Spezifität begründet sich in der Verwendung eines hoch gereinigten Proteins, das nach seinem Molekulargewicht mit p38 bezeichnet wird (SCHARES et al., 2000).

Das Testsystem dient ebenfalls der quantitativen Bestimmung von IgG- Antikörpern gegen *Neospora caninum* in Serumproben vom Rind.

Die Mikrotiterplatte wurde mit Neospora-spezifischen Protein 38 beschichtet.

Während einer Inkubationszeit bilden die Antikörper gegen Neospora in den Kavitäten der Platte mit den Antigenen einen Komplex. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Ein hinzugefügtes Enzym-Konjugat bindet an die antigengebundenen IgG Antikörper. Ein weiterer Waschschrift entfernt ungebundenes Enzymkonjugat.

Wird nun eine Substratlösung hinzugegeben erfolgt eine Farbentwicklung durch das antikörpergebundene Enzym. Dabei ist die Farbreaktion direkt proportional zur Menge von Antikörpern in der Probe. Die Bewertung erfolgt durch einen Vergleich der Extinktionswerte von Probe und Kontrollen.

3.3.3 Western Blot Technik

Neben den eben beschriebenen p38- ELISA wurde am FLI auch ein Western Blot durchgeführt. Bei dieser serologischen Untersuchungsmethode wird zunächst ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gelelektrophorese-Technik in einer Trägermatrix (SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis), native-PAGE (Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis), isoelektrische Fokussierung, 2D-Gelelektrophorese, usw.) entsprechend seiner Größe, Ladung oder anderen Eigenschaften aufgetrennt. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine zuerst mit einem Gel (meist ein Polyacrylamid-Gel) in einzelne Proteinbanden aufgetrennt.

Anschließend werden die Eiweiße beim Bloten vom Polyacrylamid - Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrozellulose, Nylon oder PVDF (Polyvinylidenedifluoride)) transferiert.

Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche haften.

Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. Im Folgenden wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Die Proteine können daher erneut renaturieren und teilweise wieder ihre Sekundär- und Tertiärstruktur einnehmen.

Dies gilt jedoch nicht für die Quartärstruktur.

Für diesen elektrophoretischen Transfer werden zwei unterschiedliche Systeme benötigt, das TANK-BLOT System und SEMIDRY-BLOT System. Der Unterschied der beiden Systeme besteht im Aufbau und der eingesetzten Puffermenge.

Nun können die Proteinbanden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern auf der Membran identifiziert werden. Diese spezifischen Antikörper (mono- oder polyklonal) binden an der passenden Proteinbande.

Unspezifisch gebundene Antikörper werden über mehrere Waschschrte mit Puffern und Detergentien wieder entfernt.

4. Ergebnisse

In den folgenden Kapiteln werden analog zu den in Kapitel 3 beschriebenen Methoden die Ergebnisse vorgestellt. Insgesamt wurden 232 Fälle aus dem gesamten nordbayerischen Raum im Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Erlangen untersucht. Dabei handelte es sich um 205 frisch abortierte Feten, in 110 Fällen mit zugehöriger Eihaut. 105 Feten waren männlichen, 83 weiblichen Geschlechtes, in 22 Fällen handelte es sich um Zwillingsträchtigkeiten. Das Alter der Feten variierte zwischen wenigen Wochen und vollendeter Reifezeit. Häufig konnte das genaue Alter nicht festgestellt werden. Unter Zuhilfenahme einer Tabelle für Scheitel-Steißlängen nach RICHTER und GÖTZE (1994) wurde der Abortmonat geschätzt.

In 49 Fällen wurde ausschließlich die Plazenta zur Untersuchung eingesandt.

Von den untersuchten 232 Fällen reagierten 23 Proben zumindest bei einer der durchgeführten Diagnostikmethoden positiv. Die detaillierten Ergebnisse finden sich in unter der jeweiligen Untersuchungsmethode.

4.1

Allgemeine Ergebnisse

Zunächst sollen auch allgemeine Daten wie Abortmonat bezüglich Jahreszeit, Abortmonat in der Trächtigkeit (Alter), Geschlecht und Differentialerreger dargestellt werden.

Die folgenden Graphiken liefern einen Überblick über den Abortmonat (Alter des Fetus) und die Jahreszeit der *Neospora caninum* assoziierten Aborte:

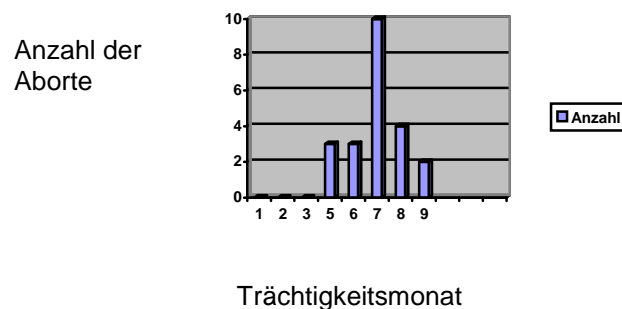


Abb. 9: Zusammenhang zwischen Trächtigkeitsmonat und Abort

Aus der Tabelle ist zu ersehen, dass die meisten Aborte im 7. und 8. Trächtigkeitsmonat stattfanden. Im ersten Trimester der Trächtigkeit

(1.-3. Trächtigkeitsmonat) wurden keine *Neospora caninum* bedingten Aborte beobachtet. Im 4. Monat lag ein Abortfall vor, im 5. Monat 3 und im 6. Monat ebenfalls 3. Der Peak der Aborte lag im 7. Trächtigkeitsmonat bei 10 Fällen.

Im 8. Monat sank die Zahl wiederum auf 4 Verwerfensfälle und in Monat 9 konnten 2 Aborte aufgrund von *Neospora caninum* erfasst werden.

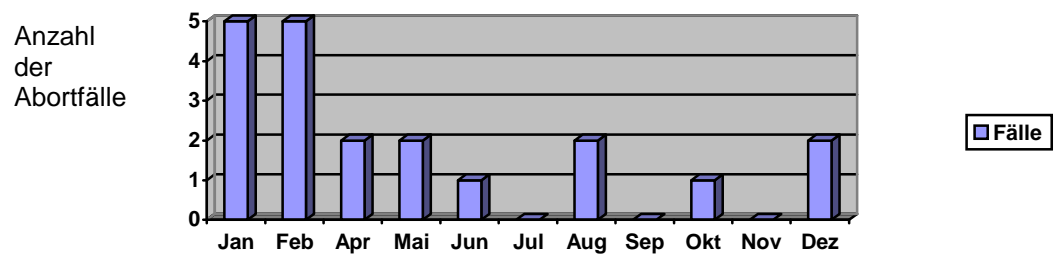


Abb. 10: Häufigkeit der Aborte nach Jahreszeit

In den Monaten Januar und Februar kam es gehäuft zu *Neospora caninum* bedingten Aborten. Die Anzahl der Verwerfensfälle war im Sommer und im Herbst geringer.

Bezüglich des Geschlechts der durch *Neospora caninum* verworfenen Feten lässt sich feststellen, dass 11 Feten männlichen Geschlechts und 9 weiblich waren. In 3 Fällen konnten keine Angaben gemacht werden.

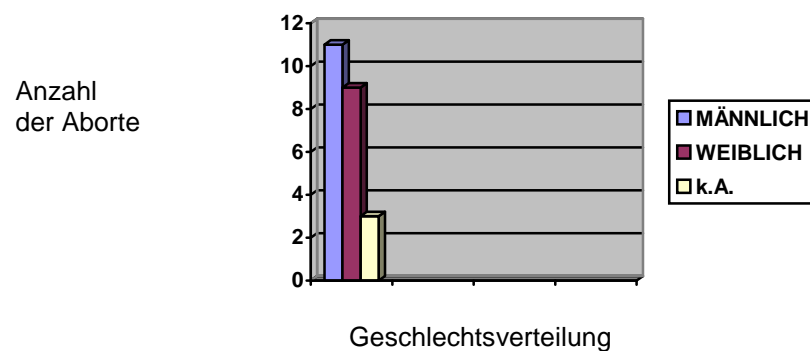


Abb. 11: Darstellung der Geschlechtsverteilung

Im Folgenden soll kurz auf die anderen, im Rahmen der allgemeinen Abortdiagnostik erfassten Erreger eingegangen werden.

4.1.1 Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung mittels Kulturverfahren

In 26 von 232 Fällen (11%) konnte *Arcanobacterium pyogenes* nachgewiesen werden, davon in vier Fällen vergesellschaftet mit anderen Aborterregern. In 12 Fällen wurde *Bacillus licheniformis*, in einem Fall *Bacillus cereus* als Abortursache ermittelt. *Listeria monocytogenes* konnte siebenmal festgestellt werden, Salmonellen zweimal (1x Salmonella Lexington, 1x Salmonella Dublin). Bei zwei Verwerfensfällen konnten Bakterien der Gattung *Campylobacter* nachgewiesen werden, in einem Fall *Campylobacter fetus subsp. venerealis* und in einem weiteren Fall *Campylobacter fetus subsp. fetus*. Darüber hinaus wurden folgende sporadische Aborterreger ermittelt: Staphylokokken (5x, ausschließlich *Staphylococcus aureus*), Streptokokken (5x, verschiedene Spezies), *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* (1x), *Yersinia pseudotuberculosis* (1x), *Vibrio parahaemolyticus* (1x).

In 6 der 23 *Neospora caninum* assoziierten Fälle lagen auch Doppelinfektionen vor. In zwei Fällen waren Mischinfektionen mit *Arcanobacterium pyogenes* zu beobachten. In jeweils einem Fall konnten *Pasteurella aerogenes*, *Listeria monozytogenes*, *Bacillus licheniformis* und *E. coli* als weitere Aborterreger ermittelt werden.

4.1.2 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung auf Chlamydien und Coxiellen

Chlamydien konnten in keinem der 232 Verwerfensfälle nachgewiesen werden. Demgegenüber wurden Coxiellen in zwei Fällen als Abortursache ermittelt, davon einmal als Koinfektion mit *Arcanobacterium pyogenes*.

4.1.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchung auf Pilze

In zwei Fällen konnten histologisch Pilze vom Typ *Aspergillus* sp. als Abortursache ermittelt werden.

4.1.4 Ergebnisse der virologischen Untersuchung BVD-Virus

In vier Abortfällen wurde das BVD-Virus nachgewiesen. Die Untersuchung erfordert fetale Organe, so dass in den Fällen, in denen ausschließlich die Eihaut zur Verfügung stand, keine virologische Untersuchung möglich war.

- 4.2 Ergebnisse der direkten Nachweisverfahren
- 4.2.1 Pathomorphologische und immunhistochemische Befunde
- 4.2.1.1 Makroskopische und histologische Befunde

Makroskopische Befunde

Charakteristische makroskopische Veränderungen lagen bei keinem mit *Neospora caninum* assoziierten Abortgeschehen vor.

Histologische Befunde

Zur histologischen Untersuchung gelangten – sofern vorhanden – Plazenta und die fetalen Organe Gehirn, Herz, Leber und Lunge, sowie in einigen Fällen auch Proben von Skelettmuskulatur und Niere.

Für die Untersuchung des Gehirns wurden jeweils drei Lokalisationen ausgewählt, je eine Probe aus dem Großhirn, aus dem Kleinhirn und aus dem Stammhirn. Bei der feingeweblichen Untersuchung an H.E.-Schnitten dieser Areale war zu erkennen, dass bei 13 von 23 mit *Neospora caninum* infizierten Rinderfeten eine multifokale granulomatöse bis granulomatös-nekrotisierende Enzephalitis vorlag.

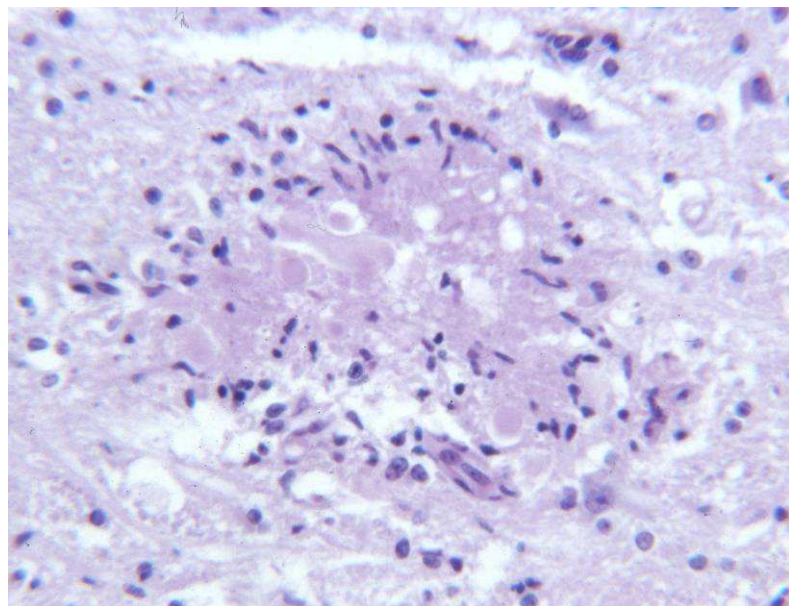


Abb. 12: Gehirngewebe abortierter Fetus, H.E.-Färbung, 400-fache Vergrößerung:
Entzündungsherd mit zentraler Nekrose und peripheren Saum aus vorwiegend mononukleären Entzündungszellen

Die entzündlichen Herde konnten dabei sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz des Nervensystems beobachtet werden. Charakteristisch waren zentrale Nekrosen mit einem peripheren Saum aus überwiegend mononukleären Zellen. Einzelne Tachyzoiten ließen sich in der H.E.-Färbung nicht erkennen; demgegenüber konnten vereinzelt in Gruppen zusammen gelegene Tachyzoiten, sog. Tachyzoiten Cluster (REITT et al., 2007) nachgewiesen werden. In einigen Fällen konnten durch die histologische Färbung auch Zysten dargestellt werden. Sie lagen ohne eine umgebende entzündliche Reaktion im Gehirngewebe.

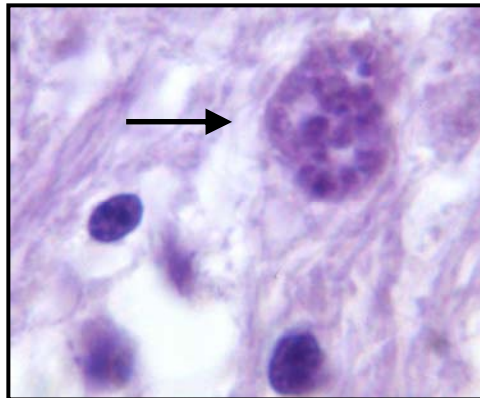


Abb. 13: Gehirngewebe abortierter Fetus, H.E.-Färbung
800-fache Vergrößerung:
Gewebezyste im Gehirngewebe

8 der 23 *Neospora caninum* assoziierten Fälle konnten aufgrund von Autolyse (6 Fälle) und Mumifikation (2 Fälle) nicht beurteilt werden.

Bei 2 der 23 *Neospora caninum* assoziierten Fälle wurden keine auffälligen Veränderungen am Gehirn beobachtet.

Am Herzen wurde in 17 von 23 mit *Neospora caninum* infizierten Fällen eine multifokale nicht-eitrige Entzündung beobachtet.

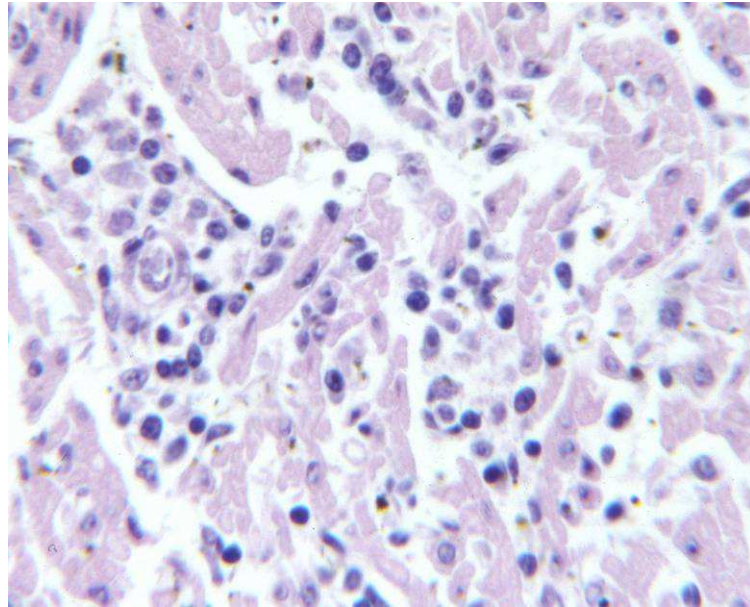


Abb. 14: Herzgewebe abortierter Fetus, H.E.-Färbung,
400-fache Vergrößerung:
Entzündungsherd

Diese betraf insbesondere das Myokard. Das Epikard war ebenfalls häufig, das Endokard seltener in das entzündliche Geschehen mit einbezogen; im positiven Fall handelte es sich hierbei überwiegend um lymphomonozytäre Infiltrate. In 4 Fällen war das Herz bereits in Autolysezustand und nicht mehr beurteilbar. In 2 Fällen waren am Herzen keine besonderen Befunde zu beobachten.

In der Leber fanden sich durchwegs periportale lymphomonozytäre Infiltrate. Lebernekrosen waren aufgrund der zumeist fortgeschrittenen Autolyse des Organs und der ausgeprägten extramedullären Hämatopoese nur schwer auszumachen.

In Niere und Lunge konnten in Fällen mit *Neospora caninum*-Infektion keine Besonderheiten festgestellt werden.

In der Skelettmuskulatur waren dagegen in 6 von 23 positiven Fällen multifokale lymphomonozytäre Infiltrate, teils vergesellschaftet mit kleinherdigen Muskelfaseruntergängen zu beobachten.

Die Plazenta zeigte in 20 von 23 Fällen mit *Neospora caninum*-Infektion eine multifokale nekrotisierende Plazentitis. Dabei konnte nicht immer sicher entschieden werden, ob die entzündlichen Veränderungen auf die Infektion mit *Neospora caninum* oder mit einem anderen Erreger zurückzuführen sind.

Die festgestellten histopathologischen Veränderungen sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

Tab. 18: Histologische Befunde bei Rinderaborten mit Nachweis von *Neospora caninum*

Nummer	Enzephalitis	Veränderung am Herzen (Epi/Myo/Endokarditis)	Plazentitis	Myositis
221- 2005	A	X	X	X
239- 2005	X	X	X	-
241- 2005	X	X	-	-
255- 2005	X	X	X	-
273- 2005	X	X	X	X
304- 2005	X	X	X	X
418- 2005	M	X	X	X
419- 2005	M	X	X	X
477- 2005	X	X	X	-
478- 2005	A	A	X	-
585- 2005	X	X	X	-
797- 2005	-	-	-	-
805- 2005	A	A	X	-
980- 2005	X	X	X	-
1128- 2005	A	A	X	-
1143- 2005	A	X	X	-
3- 2006	X	X	X	-
41- 2006	X	X	X	-
101- 2006	X	X	-	-
112- 2006	X	X	X	X
148- 2005	A	A	X	-
170- 2005	-	-	X	-
270- 2006	X	X	X	-

Legende: - keine Veränderung
 A Autolyse
 M Mumifikation
 X Auftreten der Läsion

4.2.1.2 Immunhistologische Befunde

Eine bessere Erkennung der Parasitenstadien ermöglichte die Immunhistochemie, die ausschließlich am Gehirn durchgeführt wurde. Dabei wurden nur Fälle mit verdächtigen histologischen Läsionen untersucht.

Bei der Etablierung der immunhistologischen Methodik stellte sich heraus, dass mit einer Primärantikörper-Verdünnung von 1:100 die besten Ergebnisse zu erzielen waren. Ferner wirkte sich eine Verlängerung der Inkubationszeit von 20 auf 32 Minuten vorteilhaft aus.

Der Einsatz des Blocking Kits zur Unterdrückung von unspezifischen Hintergrundfärbungen führte hingegen zu keiner Verbesserung des Färbeergebnisses.

Mit Hilfe der Immunhistochemie ließen sich sowohl einzelne Tachyzoiten als auch sogenannte Tachyzoiten-Cluster (REITT et al., 2007) erkennen. Die Tachyzoiten – von oviorder Gestalt und ca. 2-5µm groß - lagen zumeist vereinzelt, in wenigen Fällen auch in größeren Gruppen im Zentrum der nekrotischen Herde, in einem Fall (585-2005) ohne umgebende entzündliche Reaktion.

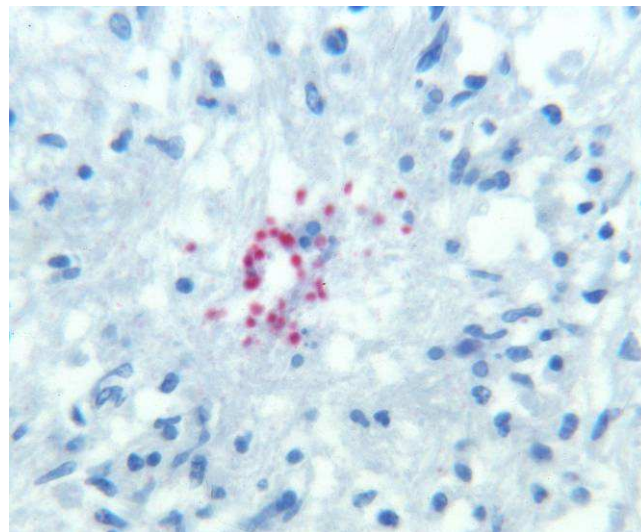


Abb. 15: Gehirngewebe abortierter Fetus, immunhistochemische Färbung, (LAB/LSAB-Methode), 400-fache Vergrößerung:
Einzelne immunhistochemisch angefärbte Tachyzoiten in einem Entzündungsherd im Gehirngewebe

In vielen Nekroseherden waren keinerlei parasitäre Strukturen zu erkennen, so dass gelegentlich mehrere Immunhistologie-Läufe nötig waren, um den Erreger im Gewebeschnitt nachweisen zu können (vgl. Tabelle 19).

Tachyzoiten-Cluster lagen ausschließlich in unveränderten Hirnarealen; eine entzündliche Begleitreaktion wurde hier in keinem Fall festgestellt

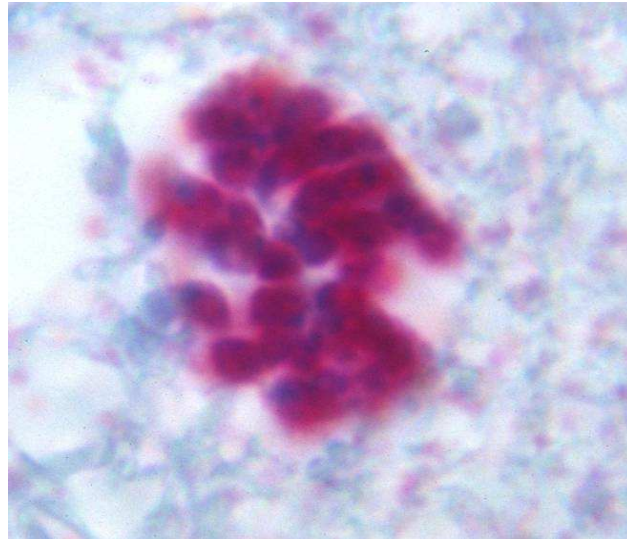


Abb. 16: Gehirngewebe abortierter Fetus, immunhistochemische Färbung, (LAB/LSAB-Methode), 400-fache Vergrößerung:
Gewebezyste

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen der Abortfälle mit Beteiligung von *Neospora caninum* sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet. Entsprechende histologische Gehirnveränderungen wurden in der Tabelle mit dargestellt, um die Übersicht zu erhalten.

Tab. 19: Übersicht über die Ergebnisse der Histopathologie und Immunhistochemie

Fall- Nummer	IHC- Läufe	Histologie – Anzahl Entzündungsherde			Immunhistologie <i>Neospora caninum</i>					
		Lokalisation 1 Stammhirn	Lokalisation 2 Kleinhirn	Lokalisation 3 Großhirn	Lokalisation 1 Stammhirn	Lokalisation 2 Kleinhirn	Lokalisation 3 Großhirn			
					T	TCI	T	TCI	T	TCI
239-2005	1	0	1	3	0	0	0	0	2	0
241-2005	1	4	0	2	2	0	0	0	1	1
255-2005	4	2	1	2	0	0	0	0	1(?)	0
		1	0	1	0	0	0	1	0	0
		0	fehlt	0	0	1	fehlt		0	0
		2	fehlt	0	1	0	fehlt		0	0
273-2005	3	1	0	2	0	0	0	0	1(?)	0
		0	0	1	0	0	0	0	0	0
		0	0	1	0	0	0	0	1(?)	0
304-2005	1	2	2	fehlt	2	0	0	0	fehlt	
418/419-2005	1	0	0	fehlt	1	1	0	0	fehlt	
477-2005	3	2	4	2	0	0	1	0	1	0
		3	1	0	1	1	0	0	0	0
		1	0	0	1	0	0	0	0	0
585-2005	3	3	2	0	0	0	0	0	1*	0
		5	1	0	0	0	0	0	1*	0
		5	2	1	1	1	1	1	1*	0
797-2005	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0
980-2005		37	12	24	19	8	5	5	16	5
3-2006	1	fehlt	3	fehlt	fehlt		0	1	fehlt	
41-2006	1	3	fehlt	fehlt	1	2	fehlt		fehlt	
101-2006	1	3	1	0	0	0	1	0	0	0
112-2006	1	2	1	0	2	0	0	1	0	0
270-2006	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0

Legende:

T = Anzahl Herde mit Tachyzoiten

TCI = Anzahl Tachyzoiten-Cluster

(?) = undeutlich erkennbar

* = Tachyzoiten ohne Entzündungsherd

4.2.2 Ergebnisse der PCR-Methoden

Auch die PCR kann wie die Immunhistochemie eine histopathologische Verdachtsdiagnose absichern. Die PCR ermöglicht zwar einen sehr sensitiven Nachweis einer *Neospora caninum*-Infektion, lässt allerdings wegen der häufigen subklinischen Infektion keine Aussage über die Bedeutung des Erregers als Abortursache zu. Aus diesem Grund ist immer eine begleitende histologische Untersuchung erforderlich. Bei der PCR kamen sowohl die Gehirne als auch die Plazenten zur Untersuchung bzw. beide Gewebe, wenn beide pro Fall vorhanden waren.

Die drei angewandten PCR-Methoden wurden zunächst einzeln optimiert. Um sicherzustellen, dass die PCR-Verfahren unter optimalen Bedingungen ablaufen, war es erforderlich die beschriebenen Verfahren zunächst an die verwendeten Reagenzien und Geräte anzupassen, d.h. sie zu optimieren. Die publizierten Daten werden dabei nach oben und unten variiert um Maxima einer eventuellen Kurve zu erkennen. Die gefundenen Optimalwerte wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet. Im Folgenden werden die einzelnen Optimierungsschritte der jeweiligen Methode näher erläutert.

4.2.2.1 Konventionelle PCR

Die bei -80°C tief gefrorenen Proben wurden für die PCR Methode wie bereits beschrieben vorbereitet, die DNA amplifiziert und dann durch die Agarosegel-Elektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung in Form von Banden sichtbar gemacht.

Zunächst wurde versucht, das publizierte Protokoll zu übernehmen. Hierbei wurde auch zunächst der in der Literatur beschriebene ForwardPrimer nach MÜLLER et al. (1996, 2002) mit dem –AC Ende der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet.

Nachdem die Anfangsergebnisse nicht ideal waren, d.h. durch andere Methoden sicher positiv bestätigte Proben konnten nicht als Banden dargestellt werden, wurden verschiedene Parameter ausgetestet.

Zunächst wurden die Proben unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt, was jedoch keinen positiven Einfluss hatte.

Auch verschiedene Experimente mit diversen Volumina des Mastermixes und der Probenmenge hatten keinen Effekt auf die Ergebnisse. Der Gedanke dabei war durch die Volumenerhöhung der Probe auch eine höhere Erreger-DNA-Ausbeute zu erzielen. Die Erhöhung des Volumens des Mastermixes sollte bessere Reaktionsbedingungen schaffen, da die einzelnen Moleküle so mehr sterischen Raum zur Reaktion erhalten. Die Tabelle 22 zeigt die Testansätze:

Tab. 20: Übersicht über die durchgeführten Testansätze

Volumen Mastermix	Volumen Probenmenge
20µl (18µl Mastermix+ 2µl Probe)	Normvolumina analog Literatur
20µl (16µl Mastermix + 4µl Probe)	Doppelte Menge im Experiment
50µl (45µl Mastermix + 5µl Probe)	Normvolumina analog Literatur
50µl (40µl Mastermix + 10µl Probe)	Doppelte Menge im Experiment

Auch der Einsatz der in Kapitel 3 beschriebenen Q-Solution, die die PCR Reaktion stabilisieren soll, hatte im Vergleich zu Ansätzen ohne Q-Solution sowohl in der vom Hersteller empfohlenen 1-fach als auch in 5-facher Konzentration keinen Effekt.

Nach Diskussion mit Dr. Großmann, CVUA Karlsruhe, Außenstelle Heidelberg, wurde die dort angewandte Modifikation des um eine Position gekürzten Forward-Primers mit dem –A Ende mit Erfolg eingesetzt.

Im Zuge des Primerwechsels wurde auch die Zyklenzahl von 35 auf 45 erhöht und damit deutlichere Banden erzielt. Wesentlich bessere Ergebnisse wurden mit den Primern der Firma OPERON (Köln) erzielt.

Die folgende Tabelle liefert einen Überblick über die positiven Fälle:

Tab. 21: Positive Fälle der konventionellen PCR

Fall-Nummer	PCR Gehirn	PCR Plazenta
221-2005	POS	-
239-2005	POS	-
241-2005	POS	-
255-2005	POS	-
273-2005	POS	-
304-2005	POS	-
418-2005	POS	POS
477-2005	POS	NEG
585-2005	POS	POS
797-2005	POS	NEG
980-2005	POS	POS
1143-2005	POS	-
3-2006	POS	POS
41-2006	POS	POS
101-2006	POS	-
270-2006	POS	NEG

Legende: - keine Plazenta vorhanden
 POS positives Ergebnis
 NEG negatives Ergebnis

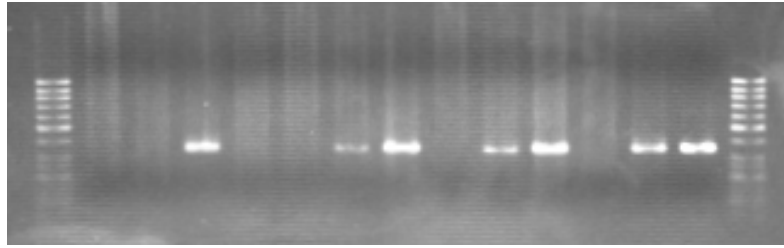
Mit dieser Methode konnten 16 positive Fälle von 232 Fällen detektiert werden, was einem Prozentsatz von 7% entspricht. In Bezug auf die 23 *Neospora caninum* assoziierten Aborte, die zumindest mit einer Methode bestätigt wurden, bedeutet dies, dass mit dieser Methode 16 der 23 Fälle detektiert werden konnte.

Das folgende Bild stellt ein Beispiel der PCR-Amplifikate in Form von Banden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid dar.

Vertikal wird die Basenpaarlänge der Amplifikate dargestellt. Dies geschieht über eine Leiter bzw. einen Marker (PeqGold 50bp DNA-Leiter der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen). Bei dieser Methode ist die *Neospora caninum* spezifische Amplifikatlänge 327 bp, was der Höhe der Skala entspricht auf der die Banden liegen.

Horizontal sind die einzelnen Spuren der Proben zu erkennen. Die positiven Proben stellen sich visuell über eine Bande dar.

Marker/
Leiter in
50 bzw.
100 bp
Stufen



Spur: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Legende:

<u>Spur 1 und 15:</u>	Marker/Leiter (50 bp DANN-Leiter)
<u>Spur 2:</u>	Negativkontrolle
<u>Spur 14:</u>	Positivkontrolle (Klon)
<u>Spur 4, 7, 8, 10, 11 und 13:</u>	positive Feldproben
<u>Spur 3, 5, 6, 9, 12:</u>	negative Feldproben

Abb. 17: Beispiel von PCR Amplifikaten in Bandenform nach einer konventionellen PCR mit Agarosegel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung

4.2.2.2 Real Time PCR: SYBR Green

Analog der konventionellen PCR wurde auch hier zunächst angestrebt, das Protokoll aus der Literatur weitgehend zu übernehmen (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002). Es wurden die publizierten Originalprimer von der Firma Roth (Karlsruhe) übernommen.

Die ersten Versuche stellten Verdünnungsreihen des Klon dar (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Dazu wurden 40 Zyklen und 60°C Annealingtemperatur gewählt. COLLANTES-FERNÁNDEZ und Mitarbeiter (2002) ermittelten eine Nachweisgrenze von 10^{-2} bis 10^4 und einen Ct-Wert von 17. Mit einem Ct (Cycle-Threshold)-Wert von 16,4 für den unverdünnten Klon (10^6) und einer Nachweisgrenze von 10^0 bis 10^6 lagen die LGL internen Ergebnisse im gleichen Nachweisbereich.

Bei dem Einsatz von Feldproben zeigte sich hingegen, dass sehr starke Hintergrundwerte auftraten, die auf Verunreinigungen bzw. eine zu hohe DNA- Konzentration schließen lassen. Zunächst wurden die Proben photometrisch gemessen, um abzuklären, ob zu viel DNA bzw. starke Verunreinigungen in den Eluaten der Extraktion enthalten waren. Nachdem diese Ursache ausgeschlossen war, wurden die Proben in den weiteren Läufen 1:10 verdünnt. Diese Maßnahme hatte einen positiven Effekt und die Hintergrundwerte blieben aus.

Desweiteren wurden die Feldproben anders als der Klon erst zu einem sehr späten Ct-Wert (teilweise erst ab einem Ct-Wert von 30) detektiert. Aus diesem Grund wurde die Zyklenzahl auf zunächst 45, später auch 50 und 55 erhöht, um so noch weitere schwach positive Proben zu detektieren. Tatsächlich wurden so positive Feldproben noch erkennbar. Je länger jedoch die Zyklen wurden, desto häufiger wurden auch zuvor negativ getestete Proben und auch die mitgeführte Wasserprobe positiv. Aus diesem Grund wurde nun versucht, die Ct-Werte zu optimieren und sie in einen vorderen Zyklenbereich zu verlegen.

Das Optimieren verlagerte sich nun auf die Änderung der Annealingtemperatur. Durch verschiedene Testansätze, die in Kapitel 3 beschrieben wurden, konnte der optimale Wert bei 55°C festgelegt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass niedrigere Annealingtemperaturen zwar zu einer höheren Sensitivität führen, aber weniger spezifisch sind. Desweiteren verschob sich der Schmelzpunkt von 79°C um ca. 1-2°C weiter nach hinten.

Bei höheren Annealingtemperaturen steigt hingegen die Spezifität, jedoch sinkt zugleich die Sensitivität.

Wesentlich bessere Ergebnisse wurden auch hier durch die Primer der Firma OPERON (Köln) erzielt. Die optimalen Parameter dieser PCR-Methode lagen bei 45 Zyklen und 55 °C Annealingtemperatur.

Die folgende Liste liefert einen Überblick über die positiven Fälle:

Tab. 22: Positive Fälle der Real Time SYBR Green Methode

Fall-Nummer	PCR Gehirn	PCR Plazenta
221-2005	POS	-
239-2005	POS	-
241-2005	POS	-
255-2005	POS	-
273-2005	POS	-
304-2005	POS	-
418-2005	POS	POS
419-2005	POS	-
477-2005	POS	NEG
585-2005	POS	POS
797-2005	POS	POS
980-2005	POS	POS
1143-2005	POS	-
3-2006	POS	POS
41-2006	POS	POS
101-2006	POS	-
270-2006	POS	POS

Legende: - keine Plazenta vorhanden
 POS positives Ergebnis
 NEG negatives Ergebnis

Mit dieser PCR-Methode konnten 17 *Neospora caninum* positive Fälle detektiert werden. In Bezug auf alle 232 untersuchten Fälle entspricht dies einem Prozentsatz von 7%. In Bezug auf die 23 *Neospora caninum* assoziierten Aborte, die zumindest mit einer Methode bestätigt wurden, bedeutet dies, dass mit dieser Methode 17 der 23 Fälle detektiert werden konnte.

Die folgenden Bilder (Abb.18) zeigen ein Beispielprotokoll der SYBR Green Methode bei einem Ansatz, bei dem der Klon verdünnt wurde. Zunächst werden die allgemeinen Daten wie Datum, Ansatzvolumen und PCR-Protokoll mit Temperaturprofil dargestellt.

Die ersten Graphiken zeigen einen Verdünnungslauf des Klon in den Stufen 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 . Auch die Plattenbelegung der einzelnen Proben ist dem Protokoll zu entnehmen.

Es lässt sich erkennen, dass die einzelnen Verdünnungsstufen in einem Abstand von 3,3 Ct erscheinen. Dies entspricht einem Korrelationskoeffizienten (Pipetiergenauigkeit) vom Wert 1. Die erste positive Probe (Klon 10^6) erschien bei einem CT-Wert von 16,4, die letzte positive Probe (10^2) bei einem CT-Wert von 29,9.

Auch der Schmelzpunkt von 79°C, wie er bei der angewandten Methode sein soll, lässt sich aus der 2. Graphik (Melt Curve= Schmelzpunktanalyse) gut ersehen.

Abb. 18: Musterprotokoll einer Real Time PCR mit SYBR Green



PCR Quantification with Melt Curve Report PCR Base Line Subtracted Curve Fit Data

Current Date: 30-Mar-07 09:25 AM
Data generated on: 08-Jun-06 at 08:21 AM.

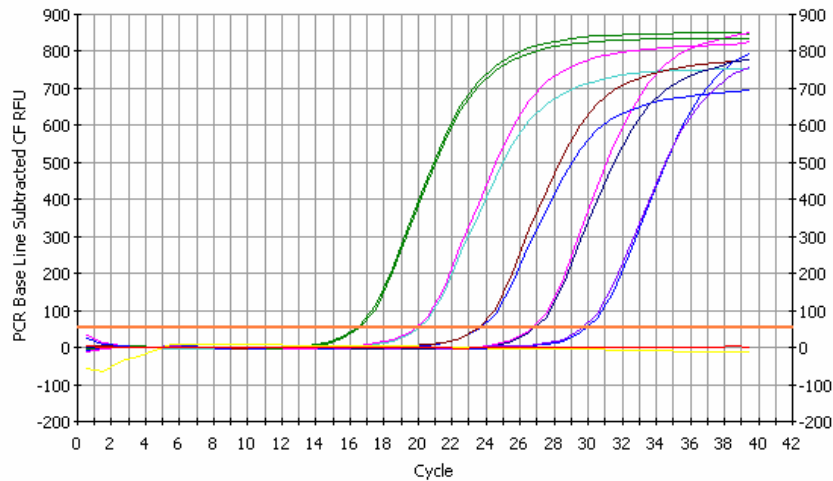
Optical data file name: Neospora08-Jun-06 0821.opd
Plate Setup file used: Neospora8.06.06.pts
Protocol file used: Neospora-60.tmo

Sample volume: 25.00 ul
Hot Start: No
Well factor collection: Experimental Plate

Comments

Protocol

Cycle 1: (1X)		
Step 1:	95.0°C	for 15:00
Cycle 2: (40X)		
Step 1:	94.0°C	for 00:20
Step 2:	60.0°C	for 01:00
Data collection enabled.		
Cycle 3: (1X)		
Step 1:	94.0°C	for 01:00
Cycle 4: (1X)		
Step 1:	55.0°C	for 01:00
Cycle 5: (80X)		
Step 1:	60.0°C	for 00:10
Increase setpoint temperature after cycle 2 by 0.5°C		
Melt curve data collection and analysis enabled.		
Cycle 6: (1X)		
Step 1:	15.0°C	HOLD

PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490**Data Analysis Parameters**

Calculated threshold using the **maximum correlation coefficient approach** is **53.0**.

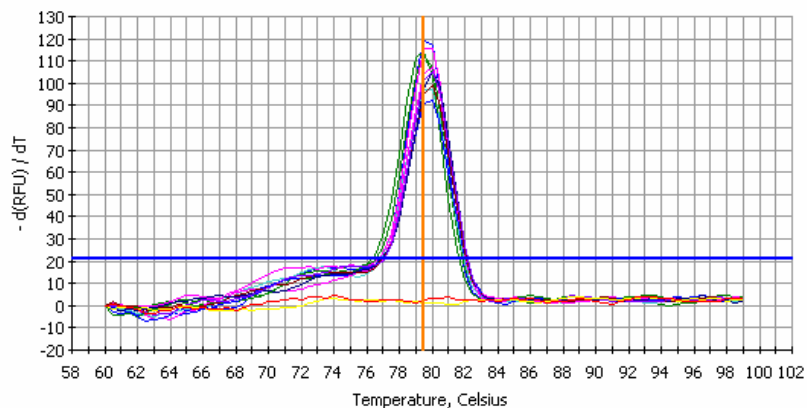
Per-well baseline cycles have been determined automatically.

Data analysis window is set at **95.00%** of a cycle, centered at **end** of the cycle.

Weighted Mean digital filtering has been applied. Global filtering is **off**.

PCR Quantification Spreadsheet Data for SYBR-490

Well	Identifier	Ct	Setpoint
H07	K0	N/A	
H06	K1	N/A	
A05	K2	29.9	
H05	K2	29.7	
H04	K3	26.8	
B04	K3	26.7	
G03	K4	23.6	
H03	K4	23.5	
B02	K5	20	
H02	K5	19.8	
G01	K6	16.6	
B01	K6	16.4	

Melt Curve Graph for SYBR-490

Melt Curve Analysis Parameters

Weighted Mean digital filtering has been applied. Global filtering is **off**.
Threshold for automatic peak detection is set at **21.29**.

Melt Curve Analysis Spreadsheet Data for SYBR-490

Well	Well Identifier Peak Descriptor	Peak ID	Melt Temp	Beg. Temp	End Temp
A5	K2	A5.2	79.5	76.0	84.5
B1	K6	B1.1	79.5	70.0	86.5
B2	K5	B2.1	79.5	76.0	85
B4	K3	B4.1	80.0	76.5	84.5
G1	K6	G1.1	79.5	67.5	84
G3	K4	G3.1	80.0	66.5	84.5
H2	K5	H2.1	80.0	71.5	87.5
H3	K4	H3.2	80.0	76.0	84
H4	K3	H4.1	80.0	70.5	84
H5	K2	H5.2	80.0	67.5	83.5

Modified Well Contents

No wells have been modified.

Im Folgenden (Abb. 19) ist im Vergleich zu einem Ansatz mit Klon auch ein Protokoll mit den eingesetzten Feldproben zu sehen. Wie bei dem vorhergehenden Protokoll sind zunächst die allgemeinen Daten wie Datum, Volumen und Temperaturprofil aufgeführt. Die Amplifikate zeigen sich in Form der graphischen Kurven; die Tabelle gibt einen Überblick über die positiven und negativen Feldproben. Die abschließende Schmelzkurvenbestimmung bestätigt die positiven Proben erneut.

Die erste positive Probe (Klon unverdünnt bei 10^6 ; also 2×10^6 Copys/ μ l) erschien bei einem Ct (Threshold Cycle)- Wert von 17,1; die letzte positive Probe (Feldprobe 101) hingegen erst bei 35,9. Der Schmelzpunkt lag bei allen positiven Proben wiederum mit +/- 1 bei 79 °C.

Der Effekt einer PCR ist wie bereits erwähnt eine ständige Verdoppelung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Reaktionszyklus und kann wie folgt beschrieben werden:

$$Y = K \cdot (1+E)^n$$

Legende:

- Y = Menge an Amplifikat
- K = Anfangskonzentration des Zielgewebes
- E = Effizienz der Reaktion
- N = Anzahl der Zyklen

In logarithmierter Form lautet die Formel:

$$\log Y = n \cdot \log (1+E) + \log K$$

Als graphische Darstellung ergibt sich eine Gerade mit Achsenabschnitt $\log K$ und Steigung $\log (1+E)$. Mit Hilfe einer solchen Darstellung kann gezeigt werden, bei welcher Zyklenzahl eine exponentielle Amplifikation mit konstanter Effizienz erfolgt. Die Effizienz beschreibt die PCR-Reaktion, also die jeweilige Verdoppelung des Amplifikats. Eine Effizienz von 100%, bei der also exponentielle Vervielfältigung vorliegt, ist anzustreben.

Auch der Korrelationskoeffizient (entspricht der Pipettiergenauigkeit) hatte einen Wert von 0,998 %. Ein Wert von 100% bedeutet, dass die Werte bei einer 10er Verdünnungsreihe- wie bereits beschrieben- genau 3,3 Zyklen auseinanderliegen.

Abb. 19: Weiteres Musterprotokoll einer Real Time PCR mit SYBR Green



PCR Quantification with Melt Curve Report PCR Base Line Subtracted Curve Fit Data

Current Date: 29-Jun-07 01:37 PM
Data generated on: 10-Aug-06 at 09:07 AM.

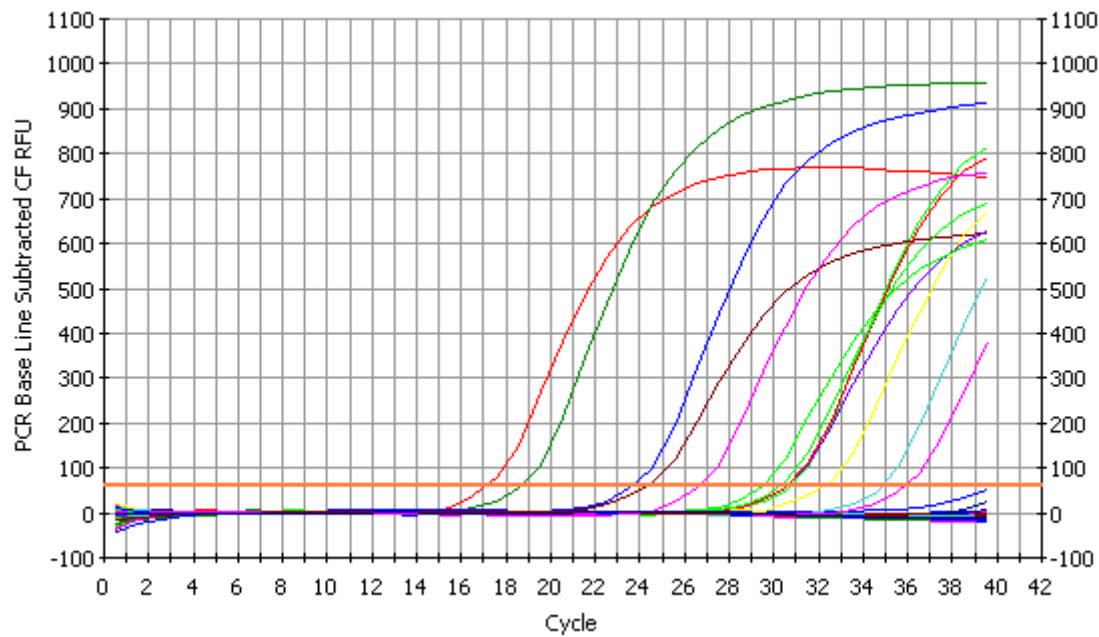
Optical data file name: NEOUNKLARE-Lauf10-Aug-06 0906.opd
Plate Setup file used: UNKLARE-Lauf10.08.06.pts
Protocol file used: Neospora-60.tmo

Sample volume: 25.00 ul
Hot Start? No
Well factor collection: Experimental Plate

Comments

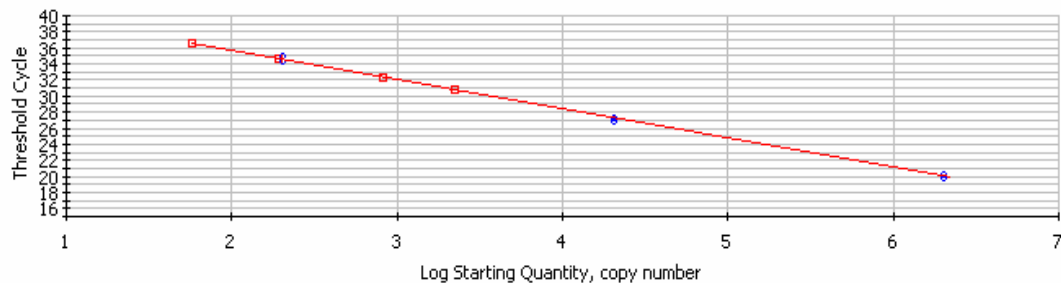
Protocol

Cycle 1: (1X)		
Step 1:	95.0°C	for 15:00
Cycle 2: (40X)		
Step 1:	94.0°C	for 00:20
Step 2:	60.0°C	for 01:00
Data collection enabled.		
Cycle 3: (1X)		
Step 1:	94.0°C	for 01:00
Cycle 4: (1X)		
Step 1:	55.0°C	for 01:00
Cycle 5: (80X)		
Step 1:	60.0°C	for 00:10
Increase setpoint temperature after cycle 2 by 0.5°C		
Melt curve data collection and analysis enabled.		
Cycle 6: (1X)		
Step 1:	15.0°C	HOLD

PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490**Standard Curve Graph for SYBR-490**

Correlation Coefficient: 0.998 Slope: -3.643 Intercept: 43.005 $Y = -3.643 X + 43.005$
 PCR Efficiency: 88.1 %

□ Unknowns
 ● Standards

**Data Analysis Parameters**

Calculated threshold using the **maximum curvature approach** is **60.2**.

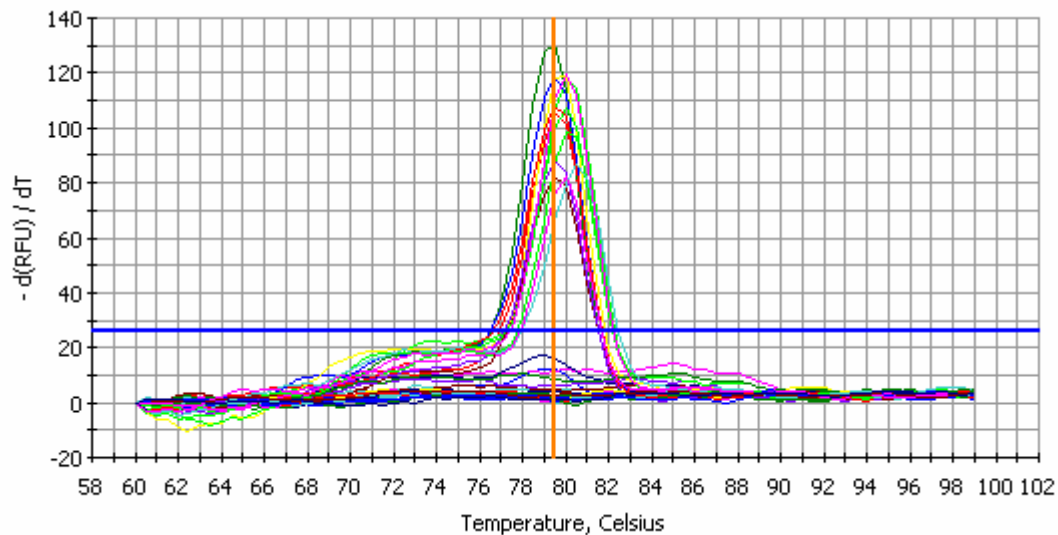
Per-well baseline cycles have been determined automatically.

Data analysis window is set at **95.00%** of a cycle, centered at **end** of the cycle.

Weighted Mean digital filtering has been applied. Global filtering is **off**.

PCR Quantification Spreadsheet Data for SYBR-490

Well	Identifier	Ct	Setpoint
A01	KLON 6	17.1	
A02	418 p	30.8	
A03	1/1/0103	N/A	
A04	148	N/A	
A05	H2O PCR	N/A	
B01	Klon 6	18.6	
B02	419	N/A	
B03	2/1/0103	N/A	
B04	148 p	N/A	
C01	KLON 4	23.7	
C02	1128	N/A	
C03	103 p-1	N/A	
C04	170	N/A	
D01	Klon 4	24.4	
D02	1129	N/A	
D03	103 p-2	N/A	
D04	270	32.2	
E01	Klon 2	30.7	
E02	1129 p	N/A	
E03	111	N/A	
E04	270 p	29.5	
F01	KLON 2	30.6	
F02	1143	30.3	
F03	111p	N/A	
F04	420	N/A	
G01	Klon 0	N/A	
G02	1/1/0101	34.8	
G03	112	N/A	
G04	980	26.6	
H01	KLON 0	N/A	
H02	2/1/0101	35.9	
H03	112p	N/A	
H04	H2O	N/A	

Melt Curve Graph for SYBR-490

Melt Curve Analysis Parameters

Weighted Mean digital filtering has been applied. Global filtering is **off**.
Threshold for automatic peak detection is set at **25.77**.

Melt Curve Analysis Spreadsheet Data for SYBR-490

Well	Well Identifier Peak Descriptor	Peak ID	Melt Temp	Beg. Temp	End Temp
A1	KLON 6	A1.2	79.5	73.5	87
A2	418 p	A2.2	80.0	76.0	84
B1	Klon 6	B1.1	79.5	74.0	84
C1	KLON 4	C1.1	79.5	70.0	83.5
D1	Klon 4	D1.1	79.5	75.5	84
D4	270	D4.2	80.0	75.5	85.5
E1	Klon 2	E1.3	79.5	65.0	84.5
E4	270 p	E4.2	80.0	74.5	84
F1	KLON 2	F1.1	79.5	67.5	84.5
F2	1143	F2.1	80.0	77.0	84
G2	101-1	G2.2	80.5	77.5	86
G4	980	G4.1	80.0	65.5	84.5
H2	101-2	H2.2	80.0	72.0	84.5

Wells Excluded from Analysis

No wells have been excluded from analysis.

Modified Well Contents

No wells have been modified.

4.2.2.3 Real Time PCR: TaqMan Sondentechnik

Nachdem bei dieser Methode von Anfang an Primer und Sonden der Firma Operon (Köln) benutzt wurden, erzielte diese PCR auf Anhieb optimale Ergebnisse. Es mussten keinerlei Modifikationen oder optimierende Testläufe angesetzt werden. Die nachfolgende Tabelle stellt die positiven Fälle dar, die mit der Sondentechnik detektiert wurden:

Tab. 23: Positive Fälle der Real Time TaqMan Sondentechnik

Fall-Nummer	PCR Gehirn	PCR Plazenta
221-2005	POS	-
239-2005	POS	-
241-2005	POS	-
255-2005	POS	-
273-2005	POS	-
304-2005	POS	-
418-2005	POS	POS
419-2005	POS	-
477-2005	POS	NEG
585-2005	POS	POS
797-2005	POS	NEG
980-2005	POS	POS
1143-2005	POS	-
3-2006	POS	POS
41-2006	POS	POS
101-2006	POS	-
148-2006	-	POS
170-2006	POS	-
270-2006	POS	POS

Legende: - keine Plazenta vorhanden
 POS positives Ergebnis
 NEG negatives Ergebnis

Mit dieser Methode konnten 19 *Neospora caninum* positive Fälle detektiert werden, was einem prozentualen Anteil von 8% an den gesamten 232 Fällen entspricht. In Bezug auf die 23 *Neospora caninum* assoziierten Aborte, die zumindest mit einer Methode bestätigt wurden, bedeutet dies, dass mit dieser Methode 19 der 23 Fälle detektiert werden konnten.

Die folgende Graphik (Abb. 20) zeigt die amplifizierten positiven Proben eines Standardansatzes mit Feldproben. Die zweite Graphik (Abb. 21) zeigt eine Standardkurve.

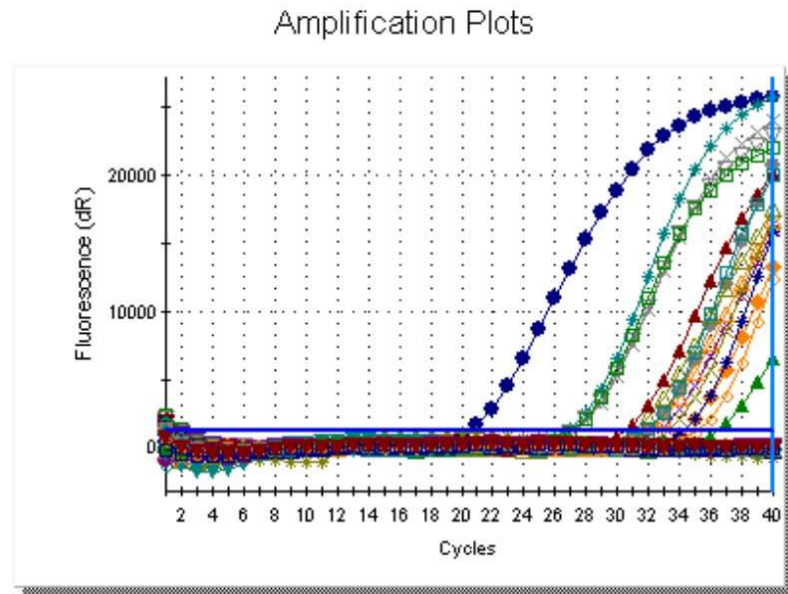


Abb. 20: Beispiel von amplifizierten positiven Proben eines Standardansatzes mit Feldproben

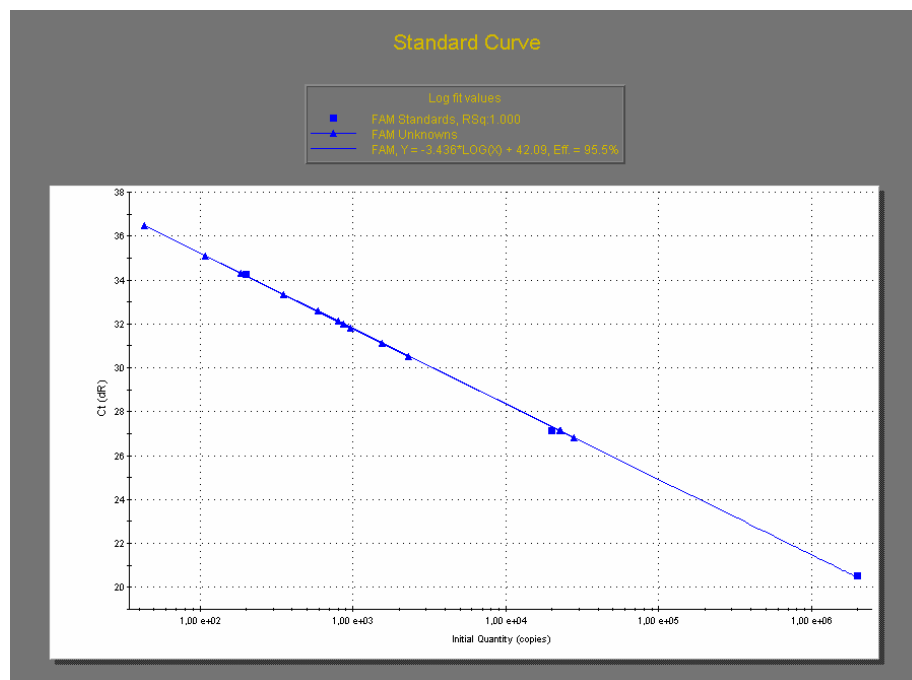


Abb. 21: Darstellung einer Standardkurve

Bei dieser Methode war die PCR mit einer Effizienz von 95,5% bei einer Korrelation von 1,000 nahezu ideal.

4.2.2.4 Vergleich der Ergebnisse der drei durchgeführten PCR-Methoden

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die drei angewandten PCR Verfahren:

Tab. 24: Vergleich der gesamten PCR Ergebnisse

Fall- Nummer	Konven. PCR		SYBR-Green PCR		TaqMan PCR	
	Gehirn	Plazenta	Gehirn	Plazenta	Gehirn	Plazenta
221-2005	POS	-	POS	-	POS	-
239-2005	POS	-	POS	-	POS	-
241-2005	POS	-	POS	-	POS	-
255-2005	POS	-	POS	-	POS	-
273-2005	POS	-	POS	-	POS	-
304-2005	POS	-	POS	-	POS	-
418-2005	POS	POS	POS	POS	POS	POS
419-2005	neg	-	POS	-	POS	-
477-2005	POS	neg	POS	neg	POS	neg
585-2005	POS	POS	POS	POS	POS	POS
797-2005	POS	neg	POS	POS	POS	neg
980-2005	POS	POS	POS	POS	POS	POS
1143-2005	POS	-	POS	-	POS	-
3-2006	POS	POS	POS	POS	POS	POS
41-2006	POS	POS	POS	POS	POS	POS
101-2006	POS	-	POS	-	POS	-
148-2006	neg	-	neg	-	POS	-
170-2006	neg	-	neg	-	POS	-
270-2006	POS	POS	POS	POS	POS	POS

Legende: - keine Plazenta vorhanden
 POS positives Ergebnis
 NEG negatives Ergebnis

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der konventionellen Methode 16, mit der Real Time SYBR GREEN Methode 17 und mit der Real Time TaqMan Sondentechnik 19 Fälle detektiert werden konnten. In der überwiegenden Zahl der Fälle erbrachten alle 3 Methoden das gleiche Ergebnis.

Die Abweichungen bei den Fällen 419, 797, 148, 170 lassen sich zum einen damit erklären, dass es nicht in jedem mutmaßlichen *Neospora caninum* assoziierten Abortfall gelingt, den Parasiten nachzuweisen, weil die Zahl der im fötalen Gewebe vorhandenen Stadien sehr gering sein kann. Aufgrund der ungleichmäßig im Gewebe verteilten Stadien von *Neospora caninum* kann in bestimmten Arealen so wenig Erregermaterial vorhanden sein, dass ein Nachweis mittels PCR nicht gelingt. Andererseits ist bekannt, dass die TaqMan PCR sensitiver ist als die konventionelle PCR.

4.3 Ergebnisse der indirekten Nachweisverfahren

4.3.1 ELISA-Methoden

Indirekte Nachweismethoden eignen sich besonders gut zur Diagnose am lebenden Tier. Die Verfahren sind diagnostisch sehr sensitiv und rasch durchführbar. Insgesamt konnten sowohl am LGL als auch am FLI 148 fetale Serumproben von Aborten aus dem nordbayerischen Raum untersucht werden.

4.3.1.1 ELISA (LGL Erlangen)

Wie bereits in Kapitel 3 beschrieben wurde der HerdChek Neospora Antikörper Test der Fa. IDEXX durchgeführt. Die Gültigkeit dieses Tests ist dann gegeben, wenn die Differenz (P-N) zwischen den Mittelwerten der positiven Kontrollen (P) und den Mittelwerten der negativen Kontrollen (N) größer oder gleich 0,150 ist. Der Wert der Negativkontrollen muss zusätzlich kleiner oder gleich 0,20 sein.

Das Fehlen oder Vorhandensein von Antikörpern gegen *Neospora caninum* wird festgestellt, indem man für jede Probe das Verhältnis Probe (P) zu positiver Kontrolle (PK) ermittelt (P:PK). Proben mit einem P:PK-Verhältnis unter 0,50 werden als negativ bewertet. Wenn das P:PK Verhältnis größer oder gleich 0,50 ist, wird die Probe als positiv für Antikörper gegen *Neospora caninum* betrachtet.

Bei den Untersuchungen reagierten 13 Proben positiv.

Tab. 25: positive Proben des ELISAs in Erlangen

Fall- Nummer	Neospora-AK
239-2005	positiv
241-2005	positiv
255-2005	positiv
273-2005	positiv
304-2005	positiv
477-2005	positiv
478-2005	positiv
797-2005	positiv
1128-2005	positiv
3-2006	positiv
41-2006	positiv
101-2006	positiv
270-2006	positiv

Mit dieser Methode konnten 13 von 148 Proben als positiv erfasst werden, was einem Prozentsatz von 9% entspricht.

4.3.1.2 p38 ELISA (FLI Wusterhausen)

Von den 148 Serumproben, die am Friedrich Loeffler Institut in Wusterhausen mit Hilfe des p38-ELISA Tests untersucht wurden, reagierten 5 Proben positiv. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 3 %.

Tab. 26: positive Proben des ELISAs in Wusterhausen

Fall - Nummer	p38- ELISA	p38- Wert
239-2005	positiv	2, 86
304-2005	positiv	0, 32
477-2005	positiv	0, 09
797-2005	positiv	1, 67
805-2005	positiv	0, 06

4.3.2 Western Blot (FLI Wusterhausen)

Bei der Immunoblot Untersuchungstechnik wurden am Friedrich Loeffler Institut ebenfalls 148 Proben untersucht.

Nach SCHARES et al. (1998,1999) liegt ein positives Ergebnis bei einem Blot vor, wenn mindestens 2 von 4 spezifischen immunodominanten Antigenbanden reagieren.

Bei den Untersuchungen waren 5 positiv und 143 negativ bewertet worden. In der folgenden Tabelle sind die nachgewiesenen Banden zu entnehmen:

Tab. 27: Ergebnisse des Western Blots

Fall- Nummer	Banden	Ergebnis
239-2005	19, 29, 30, 33, 37	positiv
304-2005	29, 30, 33, 37	positiv
477-2005	29, 30, 37	positiv
797-2005	19, 29, 30, 33, 37	positiv
101-2006	30, 37	positiv

Mit dieser Methode konnten also 5 Proben von 148 als positiv ermittelt werden, was einen Prozentsatz von 3% ergibt.

4.4 Ergebnisse aller Methoden im Vergleich

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse aller Untersuchungsmethoden zusammengefasst. Von untersuchten 232 Fällen reagierten 23 Proben zumindest bei einer der durchgeführten Diagnostikmethoden positiv. Die nachgewiesenen 23 Fälle entsprechen am gesamten Untersuchungsmaterial ca. 10%.

In vielen Fällen wurde eine *Neospora caninum* Infektion von den meisten oder sogar von allen angewandten Methoden erfasst.

Mit der Histologie ließen sich 13 Gehirnproben positiv erfassen. Mit der Immunhistochemie wurden 16 Fälle nachgewiesen. Die klassische PCR detektierte 16 Fälle, die Real Time PCR im SYBR Green Format 17 und die Real Time TaqMan Methode 19. Bei den indirekten Nachweisen konnten mit Hilfe der Serologie in Erlangen 13 und in Wusterhausen 5 Proben als positiv bewertet werden. Der Nachweis einer *Neospora caninum* Infektion mittels Immunoblot war bei 5 Proben möglich.

Tab. 28: Übersicht über die detektierten Fälle in Bezug auf die Methode

Methode	detektierte Fälle	Prozentanteil an Gesamtproben
Histologie	13	5,7%
Immunhistochemie	16	7%
Klassische PCR	16	7%
SYBR Green PCR	17	7,4%
TaqMan Technik	19	8,3%
ELISA Erlangen	13	5,7%
ELISA Wusterhausen	5	2,2%
Immunoblot Wusterhausen	5	2,2%

Die folgende Tabelle zeigt eine Gesamtübersicht über alle angewandten Untersuchungsmethoden:

Tab. 29: Gesamtübersicht über alle Ergebnisse aller angewandten Methoden

Fall	Histologie	Immun histochemie	Klass. Gehirn	PCR Plazenta	SYBR Gehirn	PCR Plazenta	TaqMan Gehirn	PCR Plazenta	ELISA LGL	ELISA FLI	WESTERN BLOT
221-2005	NEG/ A	NEG	POS	-	POS	-	POS	-	NEG	-	-
239-2005	POS	POS	POS	-	POS	-	POS	-	POS	POS	POS
241-2005	POS	POS	POS	-	POS	-	POS	-	POS	-	-
255-2005	POS	POS	POS	-	POS	-	POS	-	POS	-	-
273-2005	POS	POS	POS	-	POS	-	POS	-	POS	-	-
304-2005	POS	POS	POS	-	POS	-	POS	-	POS	POS	POS
418-2005	NEG/M	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	-	-	-
419-2005	NEG/M	POS	NEG	-	POS	-	POS	-	-	-	-
477-2005	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS
478-2005	NEG/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
585-2005	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
797-2005	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS
805-2005	NEG/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
980-2005	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
1128-2005	NEG/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	-	-
1143-2005	NEG/A	NEG	POS	-	POS	-	POS	-	-	-	-
3-2006	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
41-2006	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
101-2006	POS	POS	POS	-	POS	-	POS	-	POS	NEG	POS
112-2006	POS	POS	NEG	-	NEG	-	NEG	-	NEG	NEG	NEG
148-2006	NEG/A	NEG	NEG	-	NEG	-	POS	-	-	-	-
170-2006	NEG	NEG	NEG	-	NEG	-	POS	-	NEG	NEG	NEG
270-2006	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	-	-

Legende: - kein Material vorhanden

A Autolyse

M Mumifikation

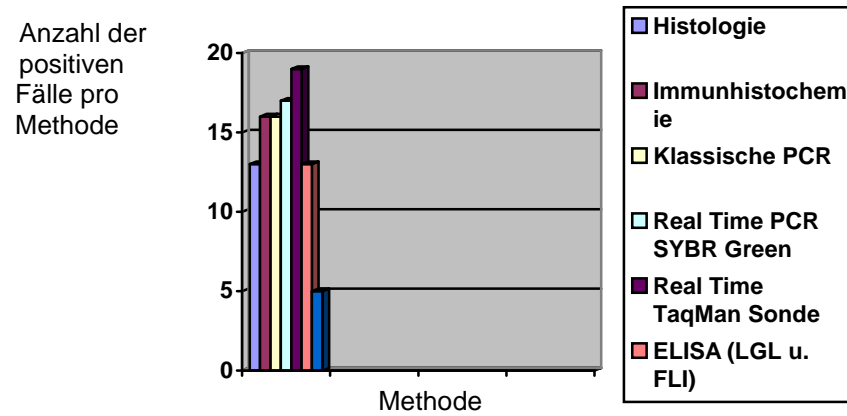


Abb. 22: Graphik über die Anzahl positiver Fälle pro Methode

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von *Neospora caninum* bei Rinderaborten in Nordbayern zu ermitteln. Ferner sollten verschiedene diagnostische Nachweistechiken verglichen und auf ihre Eignung im Rahmen von Routineuntersuchungen von Abortmaterial in der Pathologie überprüft werden.

5.1 Vorkommen und Verbreitung von *Neospora caninum*

Seit 1988 wird weltweit zunehmend über Aborte bei Rindern berichtet, für die *Neospora caninum* verantwortlich gemacht wird (DUBEY und ROMMEL, 1992). Nachdem in den USA durch THILSTED und DUBEY (1989) erstmals ein Zusammenhang zwischen Rinderaborten und *Neospora caninum* Infektionen nachgewiesen werden konnte, wurde dem Erreger weltweit Beachtung geschenkt und er wurde bald als einer der wichtigsten Aborterreger bei Rindern, Schafen und Ziegen anerkannt. Der Parasit weist ein breites Wirtsspektrum auf und konnte bislang bei 17 unterschiedlichen Tierarten in über 40 Ländern nachgewiesen werden. Eine Übertragung auf den Menschen wurde bisher nicht beobachtet (DUBEY und LINDSAY, 1996). Nach heutigem Wissensstand scheint *Neospora caninum* kein zoonotisches Potential zu besitzen (DUBEY, 1999a; GRAHAM et al., 1999; WYSS et al., 2000). Im Tierversuch konnten zwar Rhesusaffen und ihre Feten mit hochkonzentrierten Tachyzoiten-Suspensionen auf intravenösem, intramuskulärem oder intrauterinem Wege infiziert werden (BARR et al., 1994a; HO et al., 1997b), unter natürlichen Bedingungen ist jedoch nicht mit einem derartig hohen Infektionsdruck zu rechnen. Demnach wurden bei Affen bislang keine natürlichen Infektionen mit *Neospora caninum* nachgewiesen (BARR et al., 1994a; HO et al., 1997b). Auch die Untersuchung von humanen Abortfällen ergab es bisher keine Hinweise auf eine Neosporose (PETERSEN et al., 1999).

Seit der Entdeckung von *Neospora caninum* wurden weltweit viele Studien zum Vorkommen und zur Verbreitung des einzelligen Parasiten veröffentlicht. Die meisten dieser Studien basieren auf serologischen Untersuchungen, welche schnell und standardisiert durchzuführen und relativ kostengünstig sind. Mittlerweile weisen viele dieser Methoden eine hohe Sensitivität und Spezifität auf (PARÉ et al., 1995).

In Europa werden seit über 15 Jahren Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Neosporose durchgeführt. So wurden im Wesentlichen in den Niederlanden, Großbritannien, Nordirland, Dänemark, Schweden, Frankreich, Spanien, Schweiz und Deutschland epidemiologische Nachforschungen betrieben. Die Daten lieferten einen serologischen Überblick zur Verbreitung von *Neospora caninum* auf dem europäischen Kontinent (HEMPHILL et al., 2000).

Studien in Großbritannien und den Niederlanden ergaben, dass *Neospora caninum* dort den wichtigsten infektiösen Aborterreger beim Rind darstellt (DAVISON et al., 1999b; WOUDA et al., 1997).

Für die Prävalenz in Gesamteuropa ergaben sich bei den Studien signifikant divergierende Werte zwischen 2 % (Schweden) und 36% (Spanien) (HEMPHILL et al., 2000a).

Auffallend ist die relative hohe Verbreitung in Nordspanien, die vermutlich in Zusammenhang mit dem sehr milden und trockenen Klima steht. Auch in Norditalien ist die Neosporose als eine wichtige Abortursache mit einer Häufigkeit von bis zu 24,4% bekannt (MAGNINO et al., 1999).

Studien aus den Niederlanden (MOEN et al., 1998; BARTELS et al., 1999; WOUDA et al., 1999a) und aus Kalifornien (THURMOND et al., 1995) belegen, dass auch die Jahreszeit einen Einfluss auf *Neospora caninum* assoziierte Aborte hat. So kam es in den Jahren 1995 bis 1997 vor allem im Sommer und im frühen Herbst in den Niederlanden zu vermehrten Verkaltungen. In Kalifornien hingegen konnten vor allem in den Wintermonaten November bis Februar ein erhöhtes Abortrisiko beobachtet werden. In beiden Regionen herrscht ein mildes und relativ trockenes Klima, welches grundsätzlich das Überleben von Oozysten begünstigt (HEMPHILL et al., 2000a; THURMOND et al., 1995).

Grundsätzlich finden durch *Neospora caninum* induzierte Aborte während des ganzen Jahres statt (ANDERSON et al., 1991; THURMOND et al., 1995). In der vorliegenden Studie konnten Abortfälle mit Beteiligung von *Neospora caninum* während des ganzen Jahres beobachtet werden. Eine Häufung war – ähnlich wie bei den Studien aus Kalifornien - in den Monaten Januar und Februar zu erkennen. Da die vertikale Übertragung den Hauptverbreitungsweg darstellt, sind Infektionen das ganze Jahr über möglich und somit relativ unabhängig von den klimatischen Bedingungen (PARÉ et al., 1996; THURMOND und HIETALA, 1997). Eine Häufung von Aborten, d. h. klinisch manifester Fälle, im Winter hängt möglicherweise mit der in der kalten Jahreszeit verminderten Immunkompetenz und dem erhöhten allgemeinen Infektionsdruck zusammen.

Über das Vorkommen und die Verbreitung von *Neospora caninum* sowie die Bedeutung als Abortursache in deutschen Rinderherden ist noch wenig bekannt. SCHARES und Mitarbeiter beschrieben *Neospora caninum* als Abortursache bei Rindern in Deutschland (1997 und 1998). Kurz zuvor wurde in Hessen bei ersten orientierenden seroepidemiologischen Studien mittels eines Immunofluoreszenztest (IFAT) festgestellt, dass in Rinderbeständen mit Abort- und Fertilitätsproblemen eine Seroprävalenz von 4 bis 11 Prozent vorliegt (WEBER et al., 1997). Diese Häufigkeit ist mit Angaben aus Großbritannien vergleichbar (CONRATHS et al., 1996). Eine histologische und immunhistochemische Studie von SÖNDGEN et al. (2001) am Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt in Arnsberg (Nordrhein-Westfalen) ergab in 17 von 135 fetalen Rindergehirnen Hinweise auf eine Infektion mit *Neospora caninum* (entspricht ca. 13%).

Diese Vorkommenshäufigkeit deckt sich in etwa mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. In 23 von 232 Abortfällen (ca. 10%) war der Erreger mit mindestens einer der Untersuchungsmethoden direkt und / oder indirekt nachweisbar. Eine serologische Studie in Rheinland-Pfalz mittels Serum p38-ELISA ergab eine Gesamtseroprävalenz von 4% für Milchvieh und von 4,9% für Mutterkühe. Die Seroprävalenzen innerhalb der Milchviehherden lagen dabei zwischen 0% und 43%, innerhalb der Mutterkuhherden zwischen 0% und 55% (SCHARES et al., 2003). Diese Zahlen sind vergleichbar mit Beobachtungen aus den USA. Auch in den Vereinigten Staaten von Amerika liegen Nachweisraten mit bis zu 40 % vor (DUBEY und ROMMEL, 1992). Nach einer aktuellen, bisher unveröffentlichten Studie vom National Animal Health Monitoring System (NAHMS) dürften mehr als 50% der Milch- und Fleischrinderherden in den USA zumindest ein Tier mit Serumantikörpern gegen *Neospora caninum* aufweisen (BOGER, 2006).

Neben den Unterschieden zwischen Milchvieh- und Mutterkuhherden konnten SCHARES et al. (2003) auch große regionale Unterschiede in der Verteilung der seropositiven Herden erkennen. Regionen mit hohem Urbanisationsgrad wiesen eine deutlich höhere Seroprävalenz auf als stärker ländlich geprägte Regionen. Die Autoren führten dies auf die topographische Lage des landwirtschaftlichen Betriebes mit den dort vorherrschenden klimatischen Bedingungen und die lokale Hundedichte zurück. Zusätzlich gibt es weitere individuelle Risikofaktoren für landwirtschaftliche Betriebe wie Hygienemaßnahmen, Herdenmanagement und Haltung eines Hofhundes.

In Folgestudien stellten SCHARES und seine Mitarbeiter (2004) fest, dass den hofeigenen Hunden eine größere Bedeutung zukommen dürfte als der Gesamtzahl der Hunde in der jeweiligen Region.

Auch andere epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass die Haltung eines Hofhundes einen wichtigen Risikofaktor sowohl für die Infektion mit *Neospora caninum* als auch für das Auftreten von *Neospora caninum* assoziierten Aborten darstellt (BARTELS et al., 1999; HOBSON et al., 2005; MAINAR- JAIME et al., 1999; PARÉ et al., 1998; OULD- AMROUCHE et al., 1999; VON BLUMRÖDER et al., 2004; DUBEY et al., 2007).

Hofhunde, die Zugang zu Rindernachgeburten haben, können den Erregerzyklus aufrechterhalten und durch ihre Oozystenausscheidung zahlreiche Neuinfektionen im Bestand verursachen (TREES et al., 1998). Gerade das Verhalten von Hunden, Kot auf dem Futtergang abzusetzen, erhöht somit das Risiko von Infektionen und *Neospora caninum* assoziierten Aborten in einem Bestand (DIJKSTRA et al., 2002; HOBSON et al., 2005).

Serologische Studien untermauern diesen Zusammenhang (PARÉ et al., 1998; BARTELS et al., 1999). Befragungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass lediglich in 10 von 23 Betrieben, in denen Neosporose auftrat, ein eigener Hofhund gehalten wurde; in 6 Fällen hatte dieser auch Zugang zum Stall und den Nachgeburten. Ein Landwirt gab in dem Untersuchungsantrag an, dass er zwar selbst keinen eigenen Hofhund halte, er aber regelmäßig

streunende Hunde auf seinem Betriebsgelände antreffen würde. Der vertikalen Übertragung dürfte demnach auch in Nordbayern eine größere Bedeutung zukommen. Dieser Infektionsweg ist außerordentlich effektiv und führt zur Weitergabe des Erregers auf das Kalb in bis zu 9 von 10 Rindergeburten (CONRATHS u. SCHARES, 1999). Bezüglich des Urbanisationsgrades lässt sich sagen, dass die Mehrheit der Aborte der vorliegenden Studie in ländlichen Regionen auftraten und nicht im Einzugsgebiet von größeren Städten. Genauere Aussagen über einen eventuellen Zusammenhang zwischen Aborten und Besiedlungsdichte der jeweiligen Region sind jedoch aufgrund der geringen Fallzahlen und des Fehlens weiterer Angaben nicht möglich.

Man kann jedoch davon ausgehen, dass sich die Mehrzahl der Rinder in Deutschland vertikal, d.h. bereits pränatal durch die diaplazentare Übertragung der Infektion, infiziert. Dieser Übertragungsweg ist sehr effizient und sichert *Neospora caninum* für mehrere Rindergenerationen das Überleben in einer einmal infizierten Zuchtlinie (SCHARES und CONRATHS, 2007).

5.2

Pathomorphologie

Inzwischen ist bekannt, dass der primäre Übertragungsweg der Neosporose des Rindes durch kongenitale Infektion stattfindet.

Sowohl akute primäre als auch chronische Infektionen mit *Neospora caninum* können bei Rindern zu Aborten führen. Verkalbungen werden ausgelöst durch Schäden, die das Protozoon während seiner obligat intrazellulären Vermehrung nach diaplazentarem Übergang in das fetale Gewebe und im maternalen Anteil der Plazenta verursacht (SCHARES und CONRATHS, 2007). Weiterhin scheint die Infektion auch indirekt über eine Veränderung des immunologischen Gleichgewichts in der fötoplazentaren Einheit einen Abort zu begünstigen. Dies geschieht über die vermehrte Bildung entzündungsfördernder Zytokine.

Die Infektion eines tragenden Tieres kann also so direkt oder indirekt zum Verkalben führen (BARTLEY et al., 2004; GONDIM et al., 2004b; WILLIAMS et al., 2000).

In den meisten Fällen führt die diaplazentare Übertragung jedoch nicht zum Abort. Die Mehrheit der kongenital infizierten Kälber wird klinisch unauffällig geboren, ist jedoch persistent infiziert (ANDERSON et al., 1997; BARR et al., 1993; PARÉ et al., 1996; THURMOND und HIETALA, 1997).

In Abortfällen mit Beteiligung von *Neospora caninum* liegen makroskopisch keine charakteristischen Veränderungen vor (CONRATHS und SCHARES, 1999); zu diesem Ergebnis kommen wir auch in der vorliegenden Studie. Erst durch histopathologische Untersuchungen können die typischen Läsionen nachgewiesen werden. Hierzu zählen insbesondere eine Enzephalitis sowie eine Myocarditis (BARR et al., 1994; DUBEY und LINDSAY, 1996; WOUDA et al., 1997; HATTEL et al., 1998).

Laut Literatur sind die meisten Veränderungen im Gehirn zu beobachten (BARR et al., 1993; DUBEY und LINDSAY, 1996; HO et al., 1997; WOUDA et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden bei 12 der 23 *Neospora caninum* assoziierten Aborte histologische Veränderungen im Gehirn, jedoch in 17 Fällen Läsionen am Herzen beobachtet. Dies lässt sich damit erklären, dass sich viele der weiteren Gehirnproben bereits in einem autolytischen Zustand befanden und nur noch schwer beurteilt werden konnten.

In Bezug auf Alterationen am Gehirn konnten in 5 der 23 *Neospora caninum* assoziierten Fälle keinerlei auffällige Veränderungen beschrieben werden.

In 4 Fällen konnte aufgrund starker Autolyse keine Beurteilung erfolgen, ebenso wegen Mumifikation der Feten in 2 Fällen.

Die anderen 12 Fälle wiesen zumeist in mehreren Gehirnarealen Veränderungen unterschiedlicher Schweregrade auf.

In 3 Fällen war nur eine Gehirnregion verändert, in 5 Fällen 2 Areale und in 4 Fällen das gesamte Gehirn. Die meisten entzündlichen Veränderungen konnten im Stammhirn beobachtet werden.

Als besonders signifikanter Fall kann der hochgradig *Neospora caninum* infizierte Abort mit der Fallnummer 980 genannt werden. Er wies im Stammhirn 37, im Kleinhirn 12 und im Großhirn 24 Entzündungssherde auf.

Die folgende Tabelle fasst alle Fälle mit Veränderungen am Gehirn und der Anzahl der Entzündungssherde zusammen:

Tab. 30: Übersicht über Anzahl der Läsionen im Gehirn

Fall- Nummer	Histologie – Anzahl Entzündungssherde		
	Lokalisation 1 (Stammhirn)	Lokalisation 2 (Kleinhirn)	Lokalisation 3 (Großhirn)
239-2005	0	1	3
241-2005	4	0	2
255-2005	2	1	2
273-2005	1	0	2
304-2005	2	2	fehlt
477-2005	2	4	2
585-2005	5	2	1
980-2005	37	12	24
3-2006	fehlt	3	fehlt
41-2006	3	fehlt	fehlt
101-2006	3	1	0
270-2006	1	0	0

Im Vergleich der Altersklassen der Feten bezüglich der Veränderungen am Gehirn konnte festgestellt werden, dass die meisten Alterationen im 7. Abortmonat zu beobachten waren.

Tab. 31: Zusammenhang zwischen Abortmonat und Gehirnläsionen

Nummer	Abortmonat	Enzephalitis
239- 2005	7	X
241- 2005	9	X
255- 2005	7	X
273- 2005	7	X
304- 2005	6	X
477- 2005	7	X
585- 2005	7	X
980- 2005	8	X
3- 2006	7	X
41- 2006	4	X
101- 2006	7	X
270- 2006	5	X

Legende: X Auftreten von Veränderungen

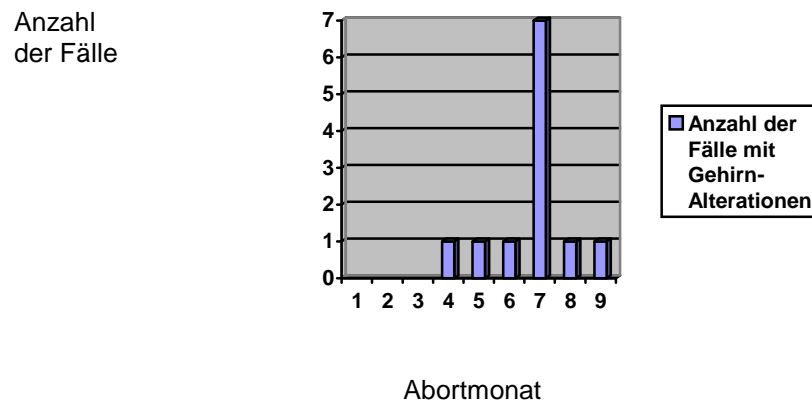


Abb. 23: Darstellung der Abortfälle mit Veränderungen am Gehirn in Bezug auf den Abortmonat

WOUDA und Mitarbeiter (1997) beobachteten beim Vergleich unterschiedlich alter Aborte, dass es keine besonders signifikanten Unterschiede des Schweregrades der Läsionen in den verschiedenen Altersklassen gibt. Bei den 3-4 Monate alten Feten waren die Gehirnveränderungen weniger prominent als bei älteren Feten, was auch diese Studie mit dem Peak im 7. Monat bestätigt hat.

Wie bereits erwähnt lagen in 17 der 23 *Neospora caninum* positiven Fälle auch Veränderungen am Herzen vor. Diese wurden bei der vorliegenden Studie jedoch aus Kosten- und Zeitgründen nur histologisch im H.E.-Schnitt untersucht.

Von nicht-eitrigen Entzündungserscheinungen war insbesondere das Myokard betroffen, wobei Makrophagen die vorherrschende Entzündungszellpopulation darstellten.

Das Epikard war ebenfalls häufig, das Endokard seltener in das entzündliche Geschehen mit einbezogen; im positiven Fall handelte es sich hierbei überwiegend um lymphomonozytäre Infiltrate.

In 4 Fällen war das Herz bereits in Autolysezustand und nicht mehr beurteilbar. In 2 Fällen waren am Herzen keine besonderen Befunde zu beobachten.

Tab. 32: Übersicht über Anzahl der Läsionen am Herzen

Nummer	Abortmonat	Veränderung am Herzen (Epi/Myo/Endocarditis)
221- 2005	5	X
239- 2005	7	X
241- 2005	9	X
255- 2005	7	X
273- 2005	7	X
304- 2005	6	X
418- 2005	7	X
419- 2005	7	X
477- 2005	7	X
478- 2005	3	-
585- 2005	7	X
797- 2005	9	-
805- 2005	7	-
980- 2005	8	X
1128- 2005	8	-
1143- 2005	5	X
3- 2006	7	X
41- 2006	4	X
101- 2006	7	X
112- 2006	8	X
148- 2005	4	-
170- 2005	7	-
270- 2006	5	X

Legende: X Auftreten von Veränderungen
 - kein Auftreten von Veränderungen

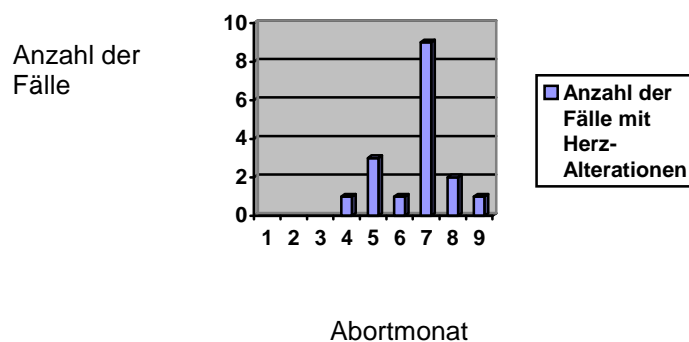


Abb. 24: Darstellung der Abortfälle mit Veränderungen am Herzen in Bezug auf den Abortmonat

Aus den Graphiken ist zu entnehmen, dass Frühaborte mehr Herz- und keine bis geringe Gehirnveränderungen aufweisen. Im Vergleich zu WOUDA und Kollegen (1997), die in den Herzen der jüngeren Feten Tachyzoiten häufiger als in den Herzen der älteren Aborte nachweisen konnten, traten bei der vorliegenden Studie auch in späteren Abortmonaten Herzveränderungen auf (9 Aborte im 7. Monat). Die Diskrepanz lässt sich am ehesten durch die differierenden Untersuchungsmethoden erklären. WOUDA und sein Team (1997) setzten zum Nachweis der Tachyzoiten immunhistochemische Untersuchungsmethoden ein, während die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit rein histologisch erbracht wurden. Ein direkter Vergleich ist daher nicht möglich.

Betrachtet man nun im Vergleich zur Histologie die Immunhistologie so kann festgestellt werden, dass zunächst mehrere immunhistochemische Untersuchungsdurchgänge nötig waren, um die Erreger im Gehirn darzustellen. Weiterhin ist zu sehen, dass auch in Fällen, die histologisch unauffällig waren (Fall 418/419 und 797) mit Hilfe der Immunhistologie dennoch Erregerstadien nachzuweisen waren.

Diese Tatsache unterstreicht signifikant die Wichtigkeit der Immunhistochemie.

Wie in der Histologie waren auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen die Veränderungen am häufigsten im Stammhirn zu beobachten. Hier konnten am häufigsten die Erregerstadien nachgewiesen werden. Es lagen sowohl einzelne Tachyzoiten als auch Tachyzoiten-Cluster vor. Ähnlich verhielt es sich im Klein- und Großhirn; es traten zwar Clusterbildungen auf, aber zumeist stieß man bei der Betrachtung auf einzelne Tachyzoiten.

Trotz der wiederholten Läufe konnte bei den meisten Fällen (9 von 14) nur in einem Bereich eine Veränderung beobachtet werden. In einem weiteren Fall an 2 Arealen und in 4 Fällen war das gesamte Gehirn mit Parasitenstadien durchsetzt. Besonders der bereits erwähnte hochgradig-veränderte Abortfall 980 wies eine hohe Anzahl an Erregerstadien in allen Gehirnanteilen auf.

Tab. 33: Übersicht über die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse

Fall- Nummer	Anzahl IHC-Läufe	Immunhistologie <i>Neospora caninum</i>					
		Lokalisation 1 (Stammhirn)		Lokalisation 2 (Kleinhirn)		Lokalisation 3 (Großhirn)	
		T	TCI	T	TCI	T	TCI
239-2005	1	0	0	0	0	2	0
241-2005	1	2	0	0	0	1	1
255-2005	4	0	0	0	0	1(?)	0
		0	0	0	1	0	0
		0	1	fehlt		0	0
		1	0	fehlt		0	0
273-2005	3	0	0	0	0	1(?)	0
		0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	1(?)	0
304-2005	1	2	0	0	0	fehlt	
418/419- 2005	1	1	1	0	0	fehlt	
477-2005	3	0	0	1	0	1	0
		1	1	0	0	0	0
		1	0	0	0	0	0
585-2005	3	0	0	0	0	1*	0
		0	0	0	0	1*	0
		1	1	1	1	1*	0
797-2005	1	0	2	0	0	0	0
980-2005		19	8	5	5	16	5
3-2006	1	fehlt		0	1	fehlt	
41-2006	1	1	2	fehlt		fehlt	
101-2006	1	0	0	1	0	0	0
270- 2006	1	0	0	2	0	0	0

Legende: T = Anzahl Herde mit Tachyzoiten
 TCI = Anzahl Tachyzoiten-Cluster
 (?) = undeutlich erkennbar
 * = Tachyzoiten ohne Entzündungsherd

Vermutlich handelt es sich bei den meisten sporadischen und endemischen Aborten bei Rindern um eine Reaktivierung einer chronischen Infektion mit *Neospora caninum*, da seropositive Tiere ein zunehmendes Abortrisiko haben. Mehrere Studien belegen, dass *Neospora caninum* positive Tiere ein 2 bis 3,5-fach höheres Abortrisiko tragen als seronegative (PARÉ et al., 1997; WOUDA et al., 1998; DAVISON et al., 1999; JENSEN et al., 1999; MAINAR-JAIME et al., 1999; STENLUND et al., 1999). Kongenital infizierte Färsen haben sogar ein noch höheres Abortrisiko während der ersten Trächtigkeit. Mit jeder nachfolgenden Trächtigkeit steigt das Abortrisiko weiter (THURMOND und HIETALA, 1997).

Die Bradyzoiten (Tachyzoiten-Cluster) dürften aufgrund der Rekrudescenz einer latenten Infektion während der Trächtigkeit reaktiviert werden. Wenn dies geschieht, werden durch Endodyogenie Tachyzoiten produziert (HEMPHILL et al., 1999), die wiederum selbst in ein paar Tagen mehrere Hundert neuer Parasiten produzieren. Die Tachyzoiten formen membrangebundene Pseudozysten aus. Ist eine kritische Anzahl vorhanden, geben die Wirtszellen die Tachyzoiten frei, die daraufhin weitere Zellen und weiteres Gewebe infizieren (HEMPHILL et al., 1999). Während sich die Tachyzoiten von Zelle zu Zelle bzw. zwischen den Geweben bewegen, erscheinen sie auch im Blut. Dieses Ereignis tritt vor allem während der Trächtigkeit auf, in der es zu einer gewissen Immunsuppression des Muttertieres kommt (QUINN et al., 2002).

Zum Zeitpunkt des fetalen Absterbens liegen mehrere Tachyzoiten in Verbindung mit Nekrosen in den fetalen Organen als auch in der Plazenta vor. Bei Studien von MILBURN und Mitarbeitern (2004) waren in den älteren Feten, 3 Wochen nach der experimentellen Infektion, weniger Tachyzoiten zu beobachten. Diese Beobachtungen bestätigen die Vermutung, dass der Parasit in der Lage ist, bei einem immunologisch-unreifen Fetus multiple, unkontrollierbare Gewebenekrosen zu verursachen und somit den Tod des Fetus zu bewirken (MILBURN et al., 2004).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten zwei derartige Fälle beschrieben werden. Es handelte sich um Feten, die im 7. (Fall 585-2005) und im 8. Monat (Fall 980) verworfen wurden. Beide wiesen hochgradige histopathologische Veränderungen an Gehirn (multifokale nekrotisierende Enzephalitis) und Herzen (nicht-eitrige Epi- und Myocarditits) auf und waren bei serologischen Untersuchungen negativ. Die hochgradigen Läsionen - vor allem bei dem hochgradig veränderten Fall 980 - sprechen dafür, dass die Feten bereits zu einem frühen Entwicklungsstadium dem Erreger ausgesetzt waren. Nur serologisch untersuchte Fälle würden so der Detektion entgehen. Somit ist ersichtlich, dass zu einer definitiven Diagnostik mehrere Methoden dringend erforderlich sind. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden alle angewendeten Untersuchungsmethoden detaillierter auf ihre Effektivität gegenübergestellt und diskutiert.

Die Studien von SÖNDGEN und Mitarbeitern (2001) zeigen die Tendenz, dass der Anteil an positiven Befunden bei allen eingesetzten Methoden (Histologie/Immunhistologie/PCR/Immunoblot und Serologie) mit zunehmendem Alter der Feten abnahm.

In 14 Fällen konnten alle 8 Untersuchungsmethoden(direkt: Histologie/Immunhistologie/ klassische PCR, Real Time SYBR Green, Real Time TaqMan; indirekt: ELISA Erlangen, ELISA Wusterhausen, Immunoblot) durchgeführt werden. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tab. 34: Anzahl der positiven Untersuchungsergebnisse in Bezug auf alle 8 durchgeführten Methoden unter Beachtung des Abortmonats

Abortmonat	Fall	Anzahl der positiven Untersuchungsmethoden
4	41	6 von 8
6	304	7 von 8
6	477	8 von 8
6	478	1 von 8
7	239	8 von 8
7	585	5 von 8
7	805	1 von 8
7	3	6 von 8
7	101	7 von 8
7	170	1 von 8
8	980	5 von 8
8	1128	1 von 8
8	112	2 von 8
9	797	7 von 8

Anzahl der auf den Abortmonat gemittelten positiven Untersuchungsergebnisse

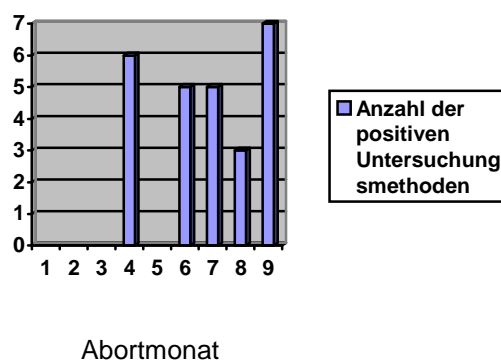


Abb. 25: Graphische Darstellung der Anzahl der positiven Untersuchungsmethoden in Bezug auf alle 8 durchgeführten Methoden unter Beachtung des Abortmonats

Der Graphik ist zu entnehmen, dass zwischen dem sechsten und dem achten Abortmonat die Ergebnisse mit denen von SÖNDGEN und Mitarbeitern (2001) korrelieren.

Der hohe Wert des Aborts im 4. Monat (Fall 41) deckt sich zwar mit dem ermittelten Verlauf kann aber da es sich um einen Einzelfall handelt nicht als tendenzweisend angesehen werden. Auch der auffällige Wert im 9. Monat ist nicht als signifikant anzusehen, da es sich hier ebenfalls nur um einen einzigen Abortfall handelt (siehe Tabelle 35).

Nicht beurteilbar ist das erste Trimester, da für diesen Zeitraum keine Abortfälle vorlagen.

In einigen Fällen lag kein Probenmaterial für serologische Untersuchungsmethoden vor. Diese Fälle konnten nur mit den fünf direkten Nachweismethoden (Histologie, Immunhistologie, klassische PCR, zwei Real Time-PCR-Methoden) untersucht werden. Die folgende Tabelle zeigt die Anzahl der positiven Untersuchungsmethoden in Bezug auf den Abortmonat:

Tab. 35: Darstellung der Anzahl der positiven Untersuchungsmethoden in Bezug auf den Abortmonat

Abortmonat	Fall	Anzahl der positiven Untersuchungsmethoden
5	221	5 von 5
5	1143	4 von 5
5	270	5 von 5
7	255	5 von 5
7	273	5 von 5
7	418	5 von 5
7	419	4 von 5
8	148	1 von 5
9	241	5 von 5

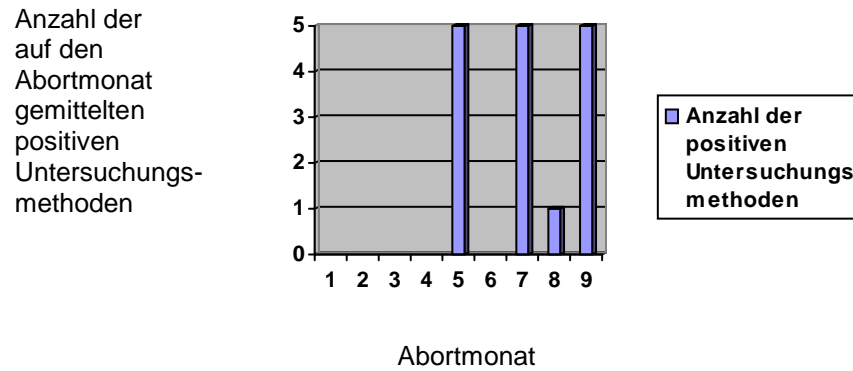


Abb. 26: Graphische Darstellung der Anzahl der positiven Untersuchungsmethoden in Bezug auf alle 5 durchgeführten Methoden unter Beachtung des Abortmonats

Durch die geringe Anzahl an Abortfällen der Monate 8 und 9 kann wiederum keine Aussage in Bezug auf die Nachweistendenz getroffen werden. Die These von SÖNDGEN und Mitarbeitern (2001) konnte also weder bestätigt noch widerlegt werden.

5.3

Methoden

Eine definitive Diagnose eines *Neospora caninum* assoziierten Aborts ist schwierig. Einige Autoren berichten, dass der *Neospora caninum* induzierte Abort am häufigsten im mittleren Trimester nachgewiesen werden kann (DUBEY u. LINDSAY, 1996; THURMOND et al., 1997). Man kann davon ausgehen, dass fötale Infektionen, die zu einem späteren Zeitpunkt der Trächtigkeit erfolgen, nicht zum Abort, sondern zur Geburt lebensschwacher Kälber oder, noch häufiger, zur Geburt klinisch gesunder aber latent mit *Neospora caninum* infizierter Kälber führen (GOTTSTEIN et al., 1999). Einerseits führen die wenigsten kongenitalen Infektionen also zu einem Abort (PARÉ et al., 1996; THURMOND and HIETALA, 1997; MOEN et al., 1998) und andererseits sagt die Detektion des Parasiten im Fetus noch nicht aus, dass er auch den Abort verursacht hat.

Auch *Toxoplasma gondii* weist ähnliche histopathologische Veränderungen bei Rindern auf und kann auch lichtmikroskopisch nur schwer von *Neospora caninum* differenziert werden (DUBEY und ROMMEL, 1992). Daher sind auch JENKINS und seine Mitarbeiter (2002), sowie PEREIRA- BUENO und sein Team (2003) der Meinung, dass unbedingt mehrere Methoden zu einer sicheren Bestätigung einer *Neospora caninum* Infektion nötig sind.

Mit der histopathologischen Untersuchung können im Gehirn und im Herzen charakteristische mikroskopische Gewebeläsionen identifiziert werden. Hier lassen sich systemische parasitäre Infektionen mit *Neospora caninum* beobachten, die oft stark genug sind, um fatale Folgen für den Fetus zu haben und den Abort auszulösen. Da jedoch auch andere Parasiten (z.B. *Toxoplasma gondii*) wie schon erwähnt ähnliche Läsionen verursachen können, sollten die histologischen Befunde mit zusätzlichen Testverfahren bestätigt werden. Im Allgemeinen stehen hierbei die Immunhistochemie zum Nachweis des Parasiten am Gewebeschnitt oder die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis der Parasiten-DNA zur Verfügung. Fetale Serologie, die spezifische Antikörper im Blut des Fetus nachweist, kann ebenso eine Infektion bestätigen (BASZLER, 2003).

In diesem Abschnitt sollen die einzelnen Methoden bezüglich ihrer Sensivität, Spezifität, des Kosten- und Zeitaufwands und ihres Aussagewertes diskutiert werden.

5.3.1

Histopathologie

Die Standardmethoden um eine kongenitale *Neospora caninum* Infektion nachzuweisen sind die Histopathologie und die Immunhistochemie (BASZLER et al., 1999).

Charakteristisch für einen *Neospora caninum* Abort sind auftretende Enzephalitiden und Myocarditiden (BARR et al., 1990 und 1994; ANDERSON et al., 1991; NIETFIELD et al., 1992; OTTER et al., 1995; DUBEY und LINDSAY, 1997; WOUDA et al., 1997; HATTEL et al., 1998). Für Untersuchungen auf *Neospora caninum* eignen sich daher Gehirn und Herz abortierter Feten am besten (OTTER et al., 1997). In der Literatur ist jedoch auch beschrieben, dass neben den Gehirn- und Herzveränderungen (nicht-eitrige Enzephalitis und Meningoenzephalitis, Nekrosen und Gliosen des Gehirns, nicht-eitrige Epi- und Myocarditis) auch weiter Plazentitis, placentare Nekrosen, Nephritis, Myositis, Hepatitis und hepatische Nekrosen beobachtet werden können. Dabei bestehen die entzündlichen Läsionen meist aus einer Akkumulation von mononukleären Entzündungszellen (HATTEL et al., 1998).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte regelmäßig eine nekrotisierende Plazentitis und periportale Infiltrate in der Leber beobachtet werden. Diese Veränderungen sind aber nicht spezifisch für *Neospora caninum*. Nierenveränderungen und Lebernekrosen konnten nicht festgestellt werden. Aufgrund der schnell eintretenden Autolyse in der Leber ist dies nur schwer zu beurteilen. Weiterhin ist die Leber in einem Fetus von Stadien der extramedullären Hämatopoese durchsetzt, die mit einer resorptiven Entzündung einer Gewebenekrose verwechselt werden kann.

Die am häufigsten veränderten Organe waren das Gehirn und das Herz. Bei 13 der 23 *Neospora caninum* assoziierten Aborte konnten parasiten-induzierte Läsionen im Gehirn beobachtet werden. Dazu zählten einerseits multifokal eitrig-nekrotisierende Enzephalitiden und andererseits das Vorkommen von Gliaknötchen im Hirnparenchym. Am Herzen wurden in 17 Fällen histopathologische Veränderungen in Form nicht-eitriger Myo- und Epikarditiden festgestellt.

Trotz der charakteristischen Veränderungen in Herz und Gehirn ist es schwierig mit der histologischen Untersuchung und der Betrachtung der H.E.-Schnitte die Diagnose eines *Neospora caninum*-Aborts zu bestätigen.

Die histologische Darstellung und Detektion der Parasitenstadien erfordert viel Erfahrung und gelingt nur selten (ROMMEL, 2000).

Durch mögliche Verwechslungen von Tachyzoiten mit Zelltrümmern in der Gewebenekrose ist eine eindeutige Ansprache in der Histologie nicht möglich. Dies gelingt nur bei Tachyzoiten-Clustern, die jedoch häufig unabhängig von Nekroseherden auftreten und daher – ohne Markierung – nur sehr schwer aufzufinden sind.

Oft finden sich in charakteristischen Läsionen keine Tachyzoiten oder Gewebszysten. Diese Tatsache lässt sich damit erklären, dass der Parasit häufig nur in geringer Anzahl auftritt und nicht gleichmäßig im Gewebe verteilt liegt (BARR et al., 1991). Zusätzlich sind in einigen Fällen Tachyzoiten oder Gewebszysten von *Neospora caninum* nicht mit Läsionen assoziiert, sondern liegen in morphologisch unveränderten Gewebearealen.

Weiterhin kann auch die Autolyse einen negativen Effekt auf die Morphologie und Antigenität des Parasiten haben und insbesondere auch bei der immunhistologischen Untersuchung schlechte Resultate verursachen (HATTEL et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit waren 6 der 23 positiven Fälle bereits in einem fortgeschritten autolytischen Zustand und zwei weitere Feten mumifiziert. In 2 Fällen mit autolytisch-verändertem Gehirn (Fall 221 und 1143) konnten jedoch trotzdem Herzläsionen beobachtet werden. Auch bei den mumifizierten Fällen (Fall 418 und Fall 419) war die Beurteilbarkeit des Gehirns soweit eingeschränkt, dass keine abschließende histologische Aussage getroffen werden konnte. Die histologische Untersuchung der Herzen zeigte jedoch charakteristische Veränderungen.

Von den genannten Fällen konnten nur die beiden Gehirnproben der mumifizierten Feten der immunhistochemischen Untersuchung zugeführt werden. Die anderen Fälle konnten regulär mit der histologischen und histochemischen Untersuchung überprüft werden.

Allgemein lässt sich sagen, dass die Histopathologie gut geeignet ist, um die für ein *Neospora caninum*-assoziiertes Abortgeschehen charakteristischen Veränderungen in den Geweben zu detektieren. Die Läsionen in Gehirn und Herz haben sich dabei als sehr spezifisch herausgestellt. In allen histopathologisch verdächtigen Läsionen konnten Entwicklungsstadien von *Neospora caninum* direkt oder indirekt nachgewiesen werden; Hinweise auf eine Beteiligung anderer Erreger (z. B. *Toxoplasma gondii*) lagen dabei nicht vor. Wir sehen daher im Gegensatz zu Jenkins et al. (2002) nicht in jedem Fall die Notwendigkeit durch weitere Untersuchungen andere Erreger auszuschließen bzw. *Neospora caninum* direkt oder indirekt nachweisen zu müssen.

Die Histopathologie ermöglicht es ferner, bei Vorliegen charakteristischer Läsionen geeignete Gewebestücke für weitere Untersuchungen wie zum Beispiel für die Immunhistochemie (CONRATHS u. SCHARES, 2004) oder die PCR (BASZLER et al., 1999) auszuwählen.

Ein Nachteil besteht darin, dass die Aussagekraft der Histopathologie vom Gewebezustand abhängt. Autolyse, die bei Feten stets vorkommt, schränkt die Beurteilbarkeit der histologischen Schnitte stark ein.

Desweiteren können Fälle mit Anwesenheit des Erregers jedoch ohne deutliche histologische Läsionen histopathologisch nur schwer diagnostiziert werden, da die histologische Darstellung und Detektion der Erregerstadien aufgrund der zumeist geringen Anzahl nur selten gelingt (ROMMEL, 2000; CONRATHS u. SCHARES, 2004). Meist können nur Tachyzoiten-Cluster eindeutig angesprochen werden.

In einem Fall (Fall 797) fanden sich histologisch keinerlei entzündliche Veränderungen im Sinne einer nekrotisierenden Enzephalitis. Da die serologische Untersuchung auf Antikörper gegen *Neospora caninum* ein positives Ergebnis erbrachte, wurde er der immunhistochemischen Untersuchung zugeführt. Hierbei konnten einzelne reaktionslos im Gewebe liegende Bradyzoiten von *Neospora caninum* nach gewiesen werden.

5.3.2 Immunhistochemie

Tachyzoiten sind am sichersten immunhistochemisch im Gehirn des Fötus nachzuweisen (ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1991; ROMMEL, 2000). Aus diesem Grund empfiehlt sich der Einsatz der Immunhistochemie. Immunhistochemische Methoden besitzen eine relativ geringe Sensitivität jedoch eine hohe Spezifität (BASZLER et al., 1999; VAN MAANEN et al., 2004).

Daten aus verschiedenen Studien ergaben, dass das routinemäßige Screening von abortierten Fetenmaterial mittels Histopathologie und einer Bestätigung der Infektion durch die Immunhistochemie nicht besonders sensitiv und für den Erregernachweis geeignet ist (DUBEY und LINDSAY, 1996; GOTTSTEIN et al., 1998).

Die Immunhistochemie kann jedoch den diagnostischen Aussagewert einer histologischen Untersuchung verbessern und eine Detektionshilfe von *Neospora caninum* in den Gewebeschnitten darstellen (DUBEY und LINDSAY, 1993), da die Veränderungen spärlich und schwer zu detektieren sein können (NIETFIELD et al., 1992; OTTER et al., 1995). Durch den Gebrauch von Immunoperoxidase-Färbungen (LINDSAY und DUBEY, 1989c) und polyklonalen Anti-*Neospora caninum*-Serum kann der Erreger viel leichter in den Gewebeschnitten durch farbliche Darstellung detektiert werden (DUBEY und LINDSAY, 1996).

In Spanien konnten GONZÁLEZ und Mitarbeiter (1999) in 50% der histologisch veränderten Fälle auch immunhistologische Läsionen nachweisen. OTTER und seinem Team (1995) gelang dies in Großbritannien in 40% der Fälle und weitere Autoren erzielten Ergebnisse zwischen 67 bis 87% (ANDERSON et al., 1995; McNAMEE et al., 1996; MORALES, 2001 und CORBELLINI et al., 2002).

Bei den vorliegenden Untersuchungen stimmten in 20 von 23 *Neospora caninum* positiven Fällen die Ergebnisse zwischen der histologischen und histochemischen Untersuchung überein.

In nur 3 Fällen kam es zu Diskrepanzen, wobei in einem Fall bei einem positiven immunhistochemischen Ergebnis ein negatives histologisches Resultat gegenüberstand (Fall 797). Bei diesem Fall waren Gehirn und Myokard unverändert. Da in diesem Fall die Serologie auf Antikörper gegen *Neospora caninum* und alle drei PCR Methoden positiv verliefen, wurde dieser Fall rückwirkend der immunhistochemischen Untersuchung zugeführt. Dabei konnten einzelne reaktionslos im Gehirn liegende Bradyzoiten von *Neospora caninum* nachgewiesen werden.

In den anderen beiden Fällen (Fall 418 und Fall 419) handelte es sich aufgrund der Mumifizierung um eingeschränkte Beurteilungsverhältnisse.

Allerdings muss erwähnt werden, dass in 4 Fällen mehrere immunhistochemische Untersuchungsläufe nötig waren, um die Befunde aus der Histologie zu bestätigen.

Dies deckt sich mit Aussagen von anderen Autoren, die behaupten, dass die Detektion und Anzahl an Organismen in engem Zusammenhang mit der benötigten Anzahl an immunhistochemischen Schnitten, Anzahl der Untersuchungsdurchläufe und der am Mikroskop benötigten Zeit stehen (WOUDA et al., 1999).

In der folgenden Tabelle ist der Vergleich zwischen Histologie und Immunhistochemie und die Anzahl der notwendigen immunhistochemischen Untersuchungsdurchgänge dargestellt:

Tab. 36: Darstellung der Ergebnisse der Histopathologie und Immunhistochemie und der Anzahl der notwendigen immunhistochemischen Untersuchungsdurchgänge

Fall	Histologie	Immunhistochemie	Anzahl der Läufe
221-2005	NEG	NEG	1
239-2005	POS	POS	1
241-2005	POS	POS	1
255-2005	POS	POS	4
273-2005	POS	POS	3
304-2005	POS	POS	1
418-2005	POS	POS	1
419-2005	POS	POS	1
477-2005	POS	POS	3
478-2005	NEG	NEG	1
585-2005	POS	POS	3
797-2005	NEG	POS	1
805-2005	NEG	NEG	1
980-2005	POS	POS	1
1128-2005	NEG	NEG	1
1143-2005	POS	NEG	1
3-2006	POS	POS	1
41-2006	POS	POS	1
101-2006	POS	POS	1
112-2006	POS	POS	1
148-2006	NEG	NEG	1
170-2006	NEG	NEG	1
270-2006	POS	POS	1

In unseren Testergebnissen lag eine hohe Übereinstimmung (20 von 23 Fällen) zwischen der Histopathologie und der Immunhistochemie vor.

Im Vergleich dazu gab es bei Ringversuchen im Jahre 2004 mit sieben europäischen Laboren beträchtliche Variationen in den Untersuchungsergebnissen. Als Gründe dafür werden neben den verschiedenen gängigen immunhistochemischen Untersuchungstechniken (indirekte und direkte Methoden, siehe Literaturteil 2.3.1.2), die zu einem Teil von der Erfahrung des Mitarbeiters abhängig sind, auch qualitativ unterschiedliche Antikörper, Antikörperversdünnungen und verschiedene enzymatische Verfahren zur Detektion des Erregers angegeben.

Vor allem die Sensivität variierte extrem zwischen den einzelnen Laboren. Bei der Spezifität hingegen herrschte weitgehend hohe Übereinstimmung. Ein Hauptgrund für die Ergebnisvariationen dürfte auch die Verteilung des Erregers in den Geweben sein.

Da der Erreger bei natürlichen Infektionen in den Geweben disseminiert vorkommt können einige angefertigte Blöcke und Schnitte keinen Erreger beinhalten und dieser somit auch nicht nachgewiesen werden (VAN MAANEN et al., 2004).

In einer Studie von WOUDA und Mitarbeitern (1997) konnten die meisten Erreger mittels Immunhistochemie im Gehirn ermittelt werden (85%). In der Leber konnten in 26% der Fälle Entwicklungsstadien von *Neospora caninum* detektiert werden und im Herzen 14%. Obwohl bei vielen Fällen eine Myokarditis zu beobachten war, gelang es nur in wenigen Fällen den Erreger tatsächlich mittels Immunhistochemie darzustellen.

Beim Vergleich der Altersklassen der Feten durch WOUDA und Mitarbeiter (1997) wurde festgestellt, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Natur der Läsionen in den verschiedenen Altersklassen gab. Bei den 3-4 Monate alten Feten waren die Gehirnveränderungen weniger prominent als bei älteren Feten. Mittels Immunhistochemie konnten mehr Tachyzoiten in den Herzen der 3-4 Monate alten Feten gefunden werden. Entgegen früherer Berichte (BARR et al., 1991) konnten WOUDA und seine Mitarbeiter auch keine vermehrten Gewebszysten in den Gehirnen der Feten unter 5 Monaten finden.

In der vorliegenden Studie kamen nur die für eine Infektion mit *Neospora caninum* histologisch-verdächtigen Fälle zur weiteren Untersuchung mittels Immunhistochemie. Allerdings wurde die Immunhistochemie aus Kosten- und Zeitgründen nur an Gehirnschnitten durchgeführt. Aus diesem kann diese Aussage in Bezug auf die Befunde am Herzen von WOUDA und Kollegen (1997) weder widerlegt noch bestätigt werden.

Wie bereits im Abschnitt der Histopathologie erwähnt können neben starken Gewebeentzündungen auch Autolyse zu negativen Effekten bei der Morphologie und Antigenität von *Neospora caninum* führen und dadurch auch den immunhistochemischen Nachweis erschweren (HATTEL, 1998).

Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass der Erreger in nur sehr geringer Anzahl in den fetalen Geweben auftreten kann (NIETFIELD et al., 1992) und somit schwer zu detektieren ist.

Mittels der Immunhistochemie gelingt es in den meisten Fällen *Neospora caninum* bei entsprechend histologisch verdächtigen Läsionen nachzuweisen. Aus diesem Grund ist eine Kombination aus Histopathologie und Immunhistochemie für die Detektion von *Neospora caninum* sinnvoll. Aufgrund möglicher subklinischer *Neospora caninum* Infektionen kann wie bereits oben erwähnt die Immunhistochemie jedoch auch schnell ihre Detektionsgrenzen erreichen (BASZLER et al., 1999).

Für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen erlauben immunhistochemische Methoden ebenfalls spezifische Aussagen. Jedoch sollte dieses Verfahren immer mit einer weiteren Methode kombiniert appliziert werden. Neben der Histopathologie bietet sich auch hierfür die PCR, Serologie der Muttertiere und die Anamnese der einzelnen Herden an. Auch ist die Immunhistochemie sehr zeit- und kostenaufwendig.

5.3.3

PCR

In der Routinediagnostik basiert die Untersuchung von *Neospora caninum*-assoziierten Aborten vornehmlich auf histopathologischen Veränderungen in fetalen Gewebeproben und einer Detektion der Parasiten im Gewebe mittels Immunhistochemie.

Da jedoch sowohl Tachyzoiten als auch Tachyzoiten-Cluster von *Neospora caninum* morphologisch oft schwer von anderen zystenbildenden, apikomplexen Parasiten wie *Toxoplasma gondii* zu unterscheiden sind, können molekularbiologische Untersuchungsmethoden einen guten Beitrag zur Identifikation des Erregers leisten (YAMAGE et al., 1996).

Gerade weil sich Gewebszysten vor allem im Gehirn und im Rückenmark ausbilden und eine Vielzahl an Gewebszysten enthalten (ANDERSON et al., 1991), stellt die PCR-Diagnostik am Zentralnervensystem ein effizientes Werkzeug für die Detektion von Stadien von *Neospora caninum* dar. So kann sie in groß angelegten epidemiologischen Studien an Gehirnen von abortierten Feten eingesetzt werden (YAMAGE et al., 1996).

Auch Gottstein und Kollegen (1998) sind der Ansicht, dass die PCR allgemein eine große diagnostische Hilfe bei der Detektion von *Neospora caninum* darstellt.

Wie bereits erwähnt hat der Nachweis durch Immunhistochemie eine niedrige Sensitivität (BASZLER et al., 1999). Nach Studien von BASZLER und Kollegen (1999) hat die Untersuchung mittels PCR-Verfahren eine deutlich höhere Sensitivität im Vergleich zur Immunhistochemie.

Bei Ringversuchen im Jahre 2004 mit sieben europäischen Laboren wurde von VAN MAANEN und Mitarbeitern (2004) ebenfalls beobachtet, dass die Sensitivität höher als bei der Immunhistochemie war und auch die Spezifität der PCR generell sehr hoch war.

SAGER und Mitarbeiter (2001) stellten fest, dass die PCR eine hochspezifische und sensitive Methode, vor allem an Gehirnproben von abortierten Feten darstellt. Die PCR war auch durch Autolyse weniger beeinträchtigt als die Histopathologie. Gerade bei autolytischen oder mumifizierten Feten ist eine histopathologische Untersuchung oft nicht mehr durchführbar. Die PCR kann hingegen auch in derartigen Fällen angewandt werden (PAULA et al., 2004).

Tab.37: Ergebnisse der drei angewandten PCR-Methoden

Fall	Klass. Gehirn	PCR Plazenta	SYBR Gehirn	PCR Plazenta	TaqMan Gehirn	PCR Plazenta
221- 2005/A	POS	-	POS	-	POS	-
418- 2005/M	POS	POS	POS	POS	POS	POS
419- 2005/M	NEG	-	POS	-	POS	-
478- 2005/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
805- 2005/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
1128- 2005/A	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
1143- 2005/A	POS	-	POS	-	POS	-
148- 2006/A	NEG	-	NEG	-	POS	-

Legende:

- kein Material vorhanden
- A Autolyse
- M Mumifikation

Die Tabelle 37 zeigt, dass in den Fällen 221, 418 und 1143 trotz Autolyse und Mumifikation und negativen histologischen Befunden alle 3 PCR Methoden ein positives Ergebnis ermittelten. In Fall 419, der ebenfalls mumifiziert und histologisch negativ war, konnte mit 2 Methoden ein positives Untersuchungsergebnis beobachtet werden. Bei Fall 148 schlug noch eine der 3 angewandten PCR Methoden positiv an. Die autolytischen Fälle 478, 805 und 1128 zeigten auch in der Histopathologie und Immunhistochemie negative Ergebnisse, allein die Serologie war positiv, was mit großer Wahrscheinlichkeit dafür spricht, dass sich der Fetus mit dem Erreger auseinandergesetzt hatte.

SÖNDGEN und ihr Team (2001) kamen auch zur Erkenntnis, dass die PCR mehr positive Fälle detektieren kann als alle anderen Techniken. In vielen der von ihnen detektierten positiven Fälle waren keine histologischen Läsionen zu beobachten. Die gleichen Beobachtungen machten auch GOTTSTEIN und Mitarbeiter (1998).

Auch in der vorliegenden Arbeit lagen zwei histologisch negativ bewertete Fälle vor, die jedoch in der PCR positive Befunde lieferten. So konnte Fall 797 mit allen 3 PCR- Verfahren detektiert werden und Fall 170 mit der Real Time PCR mit TaqMan Sonden Technik.

Es ist eine Vielfalt von PCR-Techniken entwickelt worden, um in Fällen von Rinderaborten in den Zielgeweben der Proben die Parasiten-DNA zu detektieren (LALLY et al., 1996; MÜLLER et al., 1996; YAMAGE et al., 1996; HO et al., 1997; ELLIS, 1998; GOTTSTEIN et al., 1998; BASZLER et al., 1999; ELLIS et al., 1999; SCHOCK et al., 2000).

Die PCR wird neben der Detektion und Differenzierung von Viren und Bakterien auch zum Nachweis parasitärer Pathogene eingesetzt (MORGAN und THOMPSON, 1998; McKEAND, 1998). Bisher liegen aber nur wenige Studien für den Einsatz der speziellen Real Time Techniken zur Quantifikation des Erregers vor (BELL und RANFORD-CARTWRIGHT, 2002).

Diese Methode ist schnell durchführbar und erfordert keine post-amplifikären Manipulationen wie ein Agarosegel.

Gerade die SYBR Green 1 Methode ist das Mittel der Wahl bei der Detektion des Erregers aufgrund der niedrigen Kosten und der Möglichkeit des universellen Einsatzes für alle potentiellen Marker.

Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass SYBR Green 1 auch an unspezifische doppelsträngige DNA oder Primer-Dimere bindet. Aus diesem Grund müssen fest-definierte, hochspezifische Primer mit einem minimalen Risiko zur Primer-Dimerbildung eingesetzt und auf optimierte Reaktionsbedingungen geachtet werden. Eine Besonderheit dieser Methode ist die Darstellung der Schmelzpunkte der Amplifikate, die die Anwesenheit von falschen Amplifikaten oder Primerdimeren aufzeigt (BELL und RANFORD-CARTWRIGHT, 2002).

Trotz der Entwicklung dieser molekularbiologischen Verfahren werden sie allgemein noch nicht routinemäßig angewandt (BOGER, 2006). Die Faktoren Kosten und technische Anforderungen an die Labore verhindern, dass sie noch nicht Routinestandard wurden (DUBEY, 1999).

Laut SAGER und Mitarbeitern (2001) stellt die PCR eine hochspezifische und sensitive Technik zum Nachweis einer fetalen *Neospora caninum* Infektion dar. In ihrer Studie lag jedoch eine schlechte Übereinstimmung zwischen den histopathologischen Ergebnissen und denen der PCR vor.

In der vorliegenden Studie stimmte in 15 der 23 *Neospora caninum*-assoziierten Fällen das Ergebnis der histologischen Untersuchung mit dem Befund der PCR Methoden überein. 12 dieser Fälle waren in beiden Disziplinen positiv, 3 in beiden negativ.

In 8 der 23 *Neospora caninum* assoziierten Fällen lagen Diskrepanzen vor. In 7 dieser Fälle stand ein histologisch negatives Ergebnis einem positiven PCR-Befund gegenüber. In einem Fall verhielt es sich umgekehrt.

Die Differenzen lassen sich durch Unterschiede in der Probenentnahme (Ursprung und Größe der Probe) erklären.

Ein Hauptproblem bei dem Nachweis des Parasiten ist die disseminierte Verteilung der Läsionen und des Erregers. Es ist immer möglich, dass in einem ausgesuchten Schnitt oder einer Gewebeprobe keine Parasitenstadien enthalten sind (VAN MAANEN et al., 2004).

Weiterhin ist zu bedenken, dass Infektionen mit *Neospora caninum* zu einem fetalen Tod führen können bevor sich histologische Läsionen im Gehirn oder nachweisbare Antikörperspiegel entwickelt haben (SÖNDGEN et al., 2001).

Auch HO und Kollegen (1997) stellten fest, dass oft nur in einer von drei Proben des gleichen Gewebes PCR Amplifikatprodukte nachgewiesen werden konnten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch DE MAREZ und sein Team (1999), die herausfanden, dass die PCR Analyse für *Neospora caninum*, die mit verschiedenen Anteilen der gleichen Gewebeprobe durchgeführt wurde, nicht immer positiv war, da der Erreger sehr sporadisch im Gewebe verteilt ist.

Die gründliche Homogenisierung stellt somit einen wichtigen Schritt in der Präparation der Proben für die PCR dar. Andernfalls kann es leicht zu falsch negativen Ergebnissen kommen (VAN MAANEN et al., 2004).

Eine ideale Kombination zum Nachweis von *Neospora caninum* stellt daher die Histopathologie zur Detektion von geeigneten Gewebeproben und eine zusätzliche Polymerasekettenreaktion dar. Mit Hilfe der PCR kann auch eine geringe Anzahl von Erregern nachgewiesen werden und somit ein Neospora Abort bestätigt werden (BASZLER et al., 1999).

Auch beim Vergleich von PCR und Serologie durch GOTTSTEIN und Kollegen (1998) konnten nur geringe Übereinstimmungen beobachtet werden.

Bei der vorliegenden Untersuchung lagen 6 Fälle mit einem PCR-positiven und serologisch negativen Ergebnis vor.

Diese Diskrepanz dürfte auf einen fetalen Tod während der akuten Infektionsphase zurückzuführen sein. Darüberhinaus haben auch zwei voneinander unabhängige Studien ergeben, dass in nur 50 bis 65% von bestätigten *Neospora caninum* bedingten Aborten auch spezifische Antikörper gegen *Neospora caninum* nachgewiesen werden konnten (BARR et al., 1995; WOUDA et al., 1997).

Einige Individuen sind aufgrund einer angeborenen oder erworbenen Immuntoleranz nicht in der Lage, detektierbare Antikörper gegen *Neospora caninum* zu synthetisieren (SAGER et al., 2001). Nur wenige jüngere Feten haben einen nachweisbaren Antikörpertiter gegen *Neospora caninum*.

Es gibt jedoch die Tendenz, dass die Seroprävalenz und Titer mit fortschreitenden Gestationsalter ansteigen (BARR et al., 1995; WOUDA et al., 1997a; ÁLVAREZ-GARCIA et al., 2002).

Demgegenüber konnten 3 Fälle (478, 805 und 1128) beobachtet werden, bei denen die Serologie ein positives und die PCR Verfahren ein negatives Ergebnis erbrachte. Ursache dieser Abweichung dürfte zum einen die oft nur geringe Erregermenge und sporadische Verteilung in den Geweben sein (BARR et al., 1991).

Die Abortmonate der oben genannten Fälle waren 3, 7 und 8. Diese drei Fälle waren alle autolytisch verändert und zeigten auch in der Histopathologie und Immunhistochemie negative Ergebnisse.

Weiterhin übertragen nicht alle mit *Neospora caninum* infizierten Muttertiere die Infektion während der Trächtigkeit auf den Fetus (WILLIAMS et al., 2000). Das Muttertier kann also Antikörper gegen *Neospora caninum* auf den Fetus übertragen ohne dass der Fetus auch tatsächlich infiziert ist.

Insgesamt zeigten bei der vorliegenden Arbeit 12 Fälle ein übereinstimmendes Ergebnis zwischen PCR und Serologie (11 positive und ein negativer Fall).

Obwohl eine sehr gute analytische Sensitivität und Spezifität vorliegt, sollte die PCR nicht unbedingt als goldener Standard für die Diagnose angesehen werden (PAULA et al., 2004).

Ein Nachteil der PCR Verfahren in der Routinediagnostik ist die mögliche Verschleppung von amplifizierter DNA, was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann (BASZLER et al., 1999). Kontaminationen können auf allen Ebenen der PCR auftreten (MUIR et al., 1999; PATON et al., 2000). Dem kann mit Raumkonzepten, Negativ-Kontrollen und Wasserleerproben sowie anderen Qualitätssicherungsmaßnahmen entgegengewirkt werden.

Außerdem liefert das PCR- Ergebnis auch nur eine Aussage über die Anwesenheit des Erregers, nichts jedoch über die Läsionen und die damit verbundene Pathogenese/ Bedeutung als Aborterreger.

Bei Doppelinfektionen, z.B. Fälle mit *Neospora caninum* und *Arcanobacterium pyogenes*, liefert nur die Histopathologie eine Aussage darüber, welcher Erreger Läsionen im Gewebe gesetzt hat.

Bei einer *Neosporose* ist eine nicht-eitrige Enzephalitis und Myokarditis vorherrschend; bei einer *Arcanobacterium pyogenes* Infektion eine eitrige Plazentitis und eitrige Bronchopneumonie.

Bei einem sinnvollen Einsatz kann die PCR jedoch ein sicheres und nützliches Instrument bei epidemiologischen Studien sein, und das nicht nur bezüglich der *Neosporose* sondern auch für eine Vielzahl anderer Erreger (PAULA et al., 2004).

5.3.4

Serologie

Serologische Testverfahren weisen mehrere Vorteile auf. Sie sind einfach und schnell durchführbar, kostengünstig und damit sehr gut geeignet für die Routineuntersuchung (OTTER et al., 1997).

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist auch die Möglichkeit zur Tankmilchuntersuchung, wobei jedoch eine Seroprävalenz von >10% vorliegen muss, damit die Sammelmilchprobe positiv bewertet werden kann (JOACHIM et al., 2004; SCHARES et al., 2004).

Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die bei Einzeltieren erstellte Diagnose nur für die Beurteilung dieser Einzelfälle ausreicht. Für die Beurteilung der Rolle von *Neospora caninum* als Bestandsproblem sind sie nicht aussagekräftig.

Die serologischen Tests liefern also nur eine Aussage, ob ein Tier dem Parasiten *Neospora caninum* ausgesetzt war. Sie bieten keine definitive Diagnose einer klinischen Neosporose (BOGER, 2006).

Desweiteren ist das Ergebnis sehr vom Alter des Fetus aber auch des Muttertieres abhängig. Feten haben zu Beginn ihrer Entwicklung ein noch nicht voll ausgereiftes Immunsystem und können somit noch keine Antikörper synthetisieren, die ein indirekter Test nachweisen könnte. Laut GOTTSTEIN und Kollegen (1999) ist bei einem drei Wochen alten Fetus noch keine oder nur sehr geringe Antikörpersynthese festzustellen. Eine immunologische Kompetenz gegenüber *Neospora caninum* tritt bei Rinderfeten erst ab dem 4./5. Trächtigkeitsmonat auf (SWIFT und KENNEDY, 1972; SCHARES et al., 1999), und ist auch dann noch nicht voll ausgereift. Mit einem Alter von ca. 24 Wochen scheint das Immunsystem soweit kompetent zu sein, dass bereits eine hohe Anzahl an Antikörpern nachzuweisen ist (GOTTSTEIN et al., 2002). Offenbar führt die fortschreitende Reifung des Immunsystems dazu, dass es mit zunehmenden Alter des Föten trotz der vertikalen Übertragung des Erregers auf den Fötus seltener zum Abort kommt (INNES et al., 2005). Neben dem Zeitpunkt der Infektion während der Trächtigkeit ist auch die Intensität der Exposition und die Zeitdauer zwischen dem Infekt und dem Abortgeschehen zu beachten (GONDIM et al., 2004b; MALEY et al., 2003; MACALDOWIE et al., 2004; WILLIAMS et al., 2000).

Weiterhin weisen nicht alle kongenital infizierten Tiere einen Antikörpertiter auf. Ein Fetus kann also infiziert sein ohne dass bereits ein Antikörper nachweisbar ist (PFISTER, 2002).

Studien haben ergeben, dass das Alter des Fetus auch bei der Sensitivität der fetalen Serologie eine gewichtige Rolle spielt (BARR et al., 1995; WOUDA et al., 1997). Sie ist limitiert für Feten unter 6 Monaten. Da jedoch in der Mehrheit der anderen Studien und auch in der vorliegenden Arbeit die meisten Feten älter als 5 Monate zum Zeitpunkt des Aborts waren, hat diese Limitierung für die fetale Serologie nur eine geringe praktische Bedeutung (BARR et al., 1995; WOUDA et al., 1997; SÖNDGEN et al., 2001).

Die fetale Serologie, bei der Antikörper gegen *Neospora caninum* in allen Körperhöhlenflüssigkeiten (Peritoneal-, Pleural- und Perikardialergüssen und Blut des Fetus nachgewiesen werden, kann eine histologische Diagnose bestätigen, weist jedoch nur eine Sensitivität von 50% auf (BASZLER, 2003).

Und auch bei den Muttertieren unterliegt der Antikörpertiter während der Trächtigkeit gewissen Schwankungen. Weiterhin übertragen nicht alle mit *Neospora caninum* infizierten Muttertiere die Infektion während der Trächtigkeit auf den Fetus (WILLIAMS et al., 2000).

Deshalb sind mehrmalige Untersuchungen anzuraten und die Untersuchungsergebnisse von Föten und Muttertieren in die Beurteilung mit einzubeziehen.

Im Rahmen der Sektion hat die Serologie den Nachteil, dass Blut oder Körperhöhlenflüssigkeiten z.B. bei Mumifikationen nicht immer gewonnen werden können.

Heutzutage sind verschiedene serologische Tests kommerziell erhältlich. Die meisten bisher veröffentlichten Arbeiten über fetale Serologie wurden mit IFAT (Immunfluoreszenzantikörpertest) durchgeführt (BARR et al., 1995; REICHEL und DRAKE, 1996; BUXTON et al., 1997; WOUDA et al., 1997; SÖNDGEN et al., 2001). Es existieren nur wenige Arbeiten mit der Applikation von ELISAs bei der Untersuchung von fetalen Flüssigkeiten (REICHEL und DRAKE, 1996; WOUDA et al., 1997), obwohl das ELISA-Verfahren das am häufigsten verwendete Testsystem ist (PFISTER, 2002).

Der Vergleich der beiden Verfahren ergab, dass die Anwendung des IFAT bei der Untersuchung von fetalen Flüssigkeiten geeigneter ist (REICHEL und DRAKE, 1996; WOUDA et al., 1997).

In Fällen, in denen kein abortierter Fetus zur Verfügung steht, kann auch das Blut der Mutter zur Diagnose einer *Neospora caninum* Infektion herangezogen werden.

Die maternale Serologie ist vor allem für das Abort-Monitoring in Beständen, in denen bereits *Neospora caninum* nachgewiesen wurde sehr nützlich.

Für eine individuelle Mutterkuh schließt ein negativer serologischer Test einen *Neospora* induzierten Abort aus, da alle Kühe, die *Neospora caninum* -infizierte Feten abortieren, Antikörper gegen *Neospora caninum* entwickeln (THURMOND und HIETALA, 1995).

Ein positives ELISA-Ergebnis in einer individualen Blutprobe bestätigt hingegen nicht notwendigerweise einen *Neospora caninum* Abort, da viele seropositive Kühe nicht abortieren. Das Tier kann auch aufgrund einer anderen Ursache verkalben und unabhängig davon Antikörper gegen *Neospora caninum* aufweisen (BASZLER, 2003).

Gut geeignet ist die Serologie als Herdentest zum Nachweis von *Neospora caninum*. Grundgedanke dabei ist zu bestimmen ob das Verhältnis von seropositiven verwerfenden Tieren höher ist als in seropositiven nicht verkalbenden Tieren.

Die Differenzen zwischen verkalbenden und nicht verwerfenden Tieren werden statistisch miteinander verglichen. Wenn die Anzahl der seropositiven verkalbenden Kühe signifikant höher ist als die der nichtverwerfenden Gruppe ist das Abortproblem der Herde aller Wahrscheinlichkeit auf eine Infektion mit *Neospora caninum* zurückzuführen (BASZLER, 2003).

Diese Methoden eignen sich besonders für Seren mit moderaten bis hohen Titern an *Neospora caninum* Antikörpern. Dazu zählen infizierte Mutterkühe mit steigenden Antikörper-Titern während der Trächtigkeit (CONRAD et al., 1993; PARÉ et al., 1997), Kühe, die aufgrund einer Neosporose verworfen haben (DUBEY, 1999) und infizierte Kühe und Kälber während der Geburtsperiode (ANDERSON et al., 1997; DAVISON et al., 1999).

Bei Tieren mit niedrigen Antikörpertitern können die serologischen Tests keine hinreichend sicheren Ergebnisse liefern (DUBEY et al., 1997; SCHARES et al., 1998; WOUDA et al., 1998; DUBEY, 1999). Das betrifft vor allem Kühen mit fluktuierenden oder absteigenden Titern einige Monate nach der Geburt oder dem Abort (CONRAD et al., 1993), erst kürzlich serokonvertierte Kühe oder wenige Monate alte Kälber (PARÉ et al., 1997).

Ein Vorteil der serologischen Testverfahren für die Detektion von *Neospora caninum* Infektionen beim Rind ist, dass keine Kreuzreaktionen mit dem eng verwandten Protozoon *Toxoplasma gondii* sowie anderen für das Rind relevanten Protozoen auftreten. Der IFAT (Immunofluoreszenztest) wird zur Differenzierung grenzwertiger ELISA-Ergebnisse eingesetzt. Kombiniert präsentieren die serologischen Tests eine diagnostische Gesamtsensitivität von > 95% und eine Gesamtspezifität von > 99% (SAGER et al., 2002).

Allerdings sind die Angaben über die Höhen der Cut-Off-Titer in der Literatur sehr uneinheitlich.

Dies liegt zum einen an den unterschiedlichen Laborbedingungen und auch an der Vielzahl der serologischen Testverfahren, die eine Vereinheitlichung der Ergebnisse erschweren (CONRAD et al., 1993b; DUBEY et al., 1996a; TREES et al., 1994). Ein Cut-Off Wert ist immer nur für den einen angewandten ELISA spezifisch, je nach Antigen und dessen Aufbereitung. In der vorliegenden Arbeit zeigten 13 der 23 *Neospora caninum* positiven Fälle auch bei der serologischen Untersuchung am LGL Erlangen ein positives Resultat. Bei den serologischen Untersuchungen am Friedrich Loeffler Institut in Wusterhausen ergaben sich 5 positive Ergebnisse.

Bei einem Vergleich der serologischen Untersuchungen vom FLI in Wusterhausen mit denen aus Erlangen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tab. 38: Vergleich der ELISA-Ergebnisse aus Erlangen und Wusterhausen

Fall	ELISA LGL	ELISA FLI
221-2005	NEG	-
239-2005	POS	POS
241-2005	POS	-
255-2005	POS	-
273-2005	POS	-
304-2005	POS	POS
477-2005	POS	POS
478-2005	POS	NEG
585-2005	NEG	NEG
797-2005	POS	POS
805-2005	NEG	POS
980-2005	NEG	NEG
1128-2005	POS	-
3-2006	POS	NEG
41-2006	POS	NEG
101-2006	POS	NEG
112-2006	NEG	NEG
170-2006	NEG	NEG
270-2006	POS	-

Legende: - nicht möglich, da kein Probenmaterial

In 8 Fällen stimmten die Ergebnisse aus beiden Laboren überein. In 6 Fällen konnte aufgrund von fehlenden Probenmaterials kein Vergleich gezogen werden und in 5 Fällen kam es zu Diskrepanzen.

Ursache dafür dürften die unheitlichen Angaben über die Höhen der Cut-Off-Titer in der Literatur sein. Dies liegt zum einen an den unterschiedlichen Laborbedingungen und auch an der Vielzahl der serologischen Testverfahren (unterschiedliche Sensitivität und Spezifität), die eine Vereinheitlichung der Ergebnisse erschweren (CONRAD et al., 1993b; DUBEY et al., 1996a; TREES et al., 1994).

Auch der Immunoblot, bei dem die Antikörper mit verschiedenen immunodominanten Antigenen von *Neospora caninum* reagieren (SCHARES et al., 1999), weist eine hohe Spezifität und hohe Sensitivität auf (SÖNDGEN et al., 2001). Die meisten Reaktionen erbrachten dabei die beiden immunodominanten Antigene mit Molekulargewichten von 37 und 29 kDa. Diese immunodominanten Antigene werden regelmäßig bei infizierten Tieren beobachtet (BARTA et al., 1992; BJERKAS et al., 1994; PARÉ et al., 1995).

Vergleicht man nun die beiden ELISA-Tests mit dem ebenfalls am Friedrich Loeffler Institut in Wusterhausen durchgeführten Immunoblot, so ergeben sich folgende Resultate:

Tab. 39: Ergebnisse aller 2 durchgeführten serologischen Methoden

Fall	ELISA LGL	ELISA FLI	WESTERN BLOT
221-2005	NEG	-	-
239-2005	POS	POS	POS
241-2005	POS	-	-
255-2005	POS	-	-
273-2005	POS	-	-
304-2005	POS	POS	POS
477-2005	POS	POS	POS
478-2005	POS	NEG	NEG
585-2005	NEG	NEG	NEG
797-2005	POS	POS	POS
805-2005	NEG	POS	NEG
980-2005	NEG	NEG	NEG
1128-2005	POS	-	-
3-2006	POS	NEG	NEG
41-2006	POS	NEG	NEG
101-2006	POS	NEG	POS
112-2006	NEG	NEG	NEG
170-2006	NEG	NEG	NEG
270-2006	POS	-	-

Legende: - nicht möglich, da kein Probenmaterial

In 5 Fällen erbrachte der Immunoblot ein positives Ergebnis (Fälle 239, 304, 477, 797 und 101).

Bei 6 Fällen konnte aufgrund von fehlenden Probenmaterials kein Western Blot durchgeführt werden. In 8 Fällen deckten sich die Ergebnisse (positive und negative) aller 3 serologischen Untersuchungsmethoden. In 5 Fällen lagen Diskrepanzen in den Ergebnissen vor. In 3 Fällen lag bei den serologischen Untersuchungen in Erlangen ein positives Ergebnis vor, bei denen der Immunoblot jedoch negativ verlief. Weiterhin lag ein serologisch positiver Fall in Wusterhausen vor, bei dem der Immunoblot ebenfalls negativ verlief. Der 5. Fall war bei der serologischen Untersuchung und auch im Immunoblot positiv und im ELISA am FLI in Wusterhausen negativ.

Ein Nachteil dieser Methode ist die Entnahmestelle und Qualität der zu untersuchenden Flüssigkeit. Optimale Ergebnisse in der Sensitivität ließen sich bei der Peritonealflüssigkeit erzielen. Ein Grund dafür könnte die bereits einsetzende Autolyse in anderen Organen sein, die einen negativen Effekt auf die Konzentration der spezifischen Antikörper hat (SÖNDGEN et al, 2001).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Körperhöhlenflüssigkeitsproben zur Untersuchung verwendet.

Setzt man nun alle drei serologischen Untersuchungsmethoden in Korrelation zu den Ergebnissen der Histopathologie, so ist zu beobachten, dass die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen der fetalen Blutproben gute Korrelationen mit den histologischen Befunden zeigen. Die Sensitivität und Spezifität dieser Tests waren geringer als bei den anderen angewandten Methoden.

In den 23 *Neospora caninum* assoziierten Abortfällen stimmte in 11 Fällen das Ergebnis der Histologie mit den am LGL in Erlangen durchgeführten serologischen Untersuchungen überein. In 8 Fällen war keine Übereinstimmung erkennbar und in 4 Fällen war kein Vergleich möglich, da kein Probenmaterial für serologische Untersuchungen zur Verfügung stand.

Die Ergebnisse aus Wusterhausen decken sich mit der Histopathologie in 4 Fällen und der Immunoblot zeigt in 6 Fällen eine Übereinstimmung der Ergebnisse. Es muss jedoch erwähnt werden, dass in 6 der 19 zu vergleichenden Fälle aufgrund von fehlenden Probenmaterials keine serologischen Untersuchungen mittels ELISA und im Western Blot am FLI Wusterhausen möglich waren. In 3 Fällen stimmten alle drei serologischen Diagnostikmethoden mit den histologischen Resultaten überein.

Tab. 40: Vergleich der serologischen und histopathologischen Ergebnisse

Fall	Histologie	ELISA LGL	ELISA FLI	WESTERN BLOT
221-2005	POS	NEG	-	-
239-2005	POS	POS	POS	POS
241-2005	POS	POS	-	-
255-2005	POS	POS	-	-
273-2005	POS	POS	-	-
304-2005	NEG	POS	POS	POS
477-2005	POS	POS	POS	POS
478-2005	NEG	POS	NEG	NEG
585-2005	POS	NEG	NEG	NEG
797-2005	NEG	POS	POS	POS
805-2005	NEG	NEG	POS	NEG
980-2005	POS	NEG	NEG	NEG
1128-2005	NEG	POS	-	-
3-2006	POS	POS	NEG	NEG
41-2006	POS	POS	NEG	NEG
101-2006	POS	POS	NEG	POS
112-2006	POS	NEG	NEG	NEG
170-2006	NEG	NEG	NEG	NEG
270-2006	POS	POS	-	-

Legende: - nicht möglich, da kein Probenmaterial

Ingesamt lagen mehr serologisch positive Fälle als histologisch-positive Fälle vor. Daraus resultiert, dass die Histopathologie eine geringere diagnostische Sensitivität als die Serologie besitzt. (REICHEL und DRAKE, 1996).

Für die Diskrepanzen zwischen den serologischen und histopathologischen Befunden gibt es mehrere Ursachen.

Zum einen können Kühe bei einer *Neospora caninum*-Infektion, die zu schwach ist um einen Abort auszulösen, serokonvertieren.

Es ist bekannt, dass Infektionen in späten Trächtigkeitsstadien höchstwahrscheinlich zu keiner letalen Schädigung der Feten sondern zu einem klinisch-unauffälligen, mit *Neospora caninum* lebenslang infizierten Kalb führen (BARR et al., 1993; GOTTSTEIN et al., 1999).

Serologisch positive und histologisch negative Befunde kommen eventuell daher, dass kleine, fokale Läsionen bei der Detektion in der Routineuntersuchung nicht erfasst werden oder die Proben sich bereits in einem fortgeschrittenen Autolysezustand befinden und so die mikroskopische Befunderhebung erschweren. Weiterhin ist möglich, dass Neosporose auch ohne pathohistologischen Läsionen auftreten kann.

JENKINS und Kollegen (2002) betonen, dass eine auf rein serologischer Basis beruhende Diagnose der Neosporose leicht zu Fehlinterpretationen führen kann, da nicht bei jeder seropositiven Kuh auch Aborte oder kongenitale Infektionen beobachtet werden können.

Demgegenüber können serologisch negative und histologisch positive Proben von Feten möglicherweise durch die Immuninkompetenz der Feten erklärt werden, die in einem frühen Gestationsalter noch nicht in der Lage sind detektierbare Antikörpertiter gegen *Neospora caninum* zu entwickeln bevor sie abortiert werden. Diese These wird durch Beobachtungen aus Kalifornien unterstützt, die belegen, dass die Sensitivität der fetalen *Neospora caninum*-Serologie in direktem Bezug zum Gestationsalter steht. Bei Feten die bis zum 5. Monat verworfen wurden, war sie sehr gering (21%), bei Feten zwischen dem 8. und 9. Monat der Gestation erreichte sie Werte bis zu 93%. So nimmt die Seroprävalenz mit zunehmendem Alter der Feten zu (BARR et al., 1995). Auch weitere Autoren wie WOUDA und Kollegen (1997a) und ALVAREZ- GARCIA und Mitarbeiter (2002) bestätigen diese Tendenz, dass sowohl die Seroprävalenz aber auch die Titer mit dem Gestationsalter ansteigen.

Die folgende Tabelle und nachfolgende Graphik stellen die Ergebnisse der einzelnen serologischen Untersuchungsmethoden in Relation zum Abortmonat dar:

Tab.41: Serologische Untersuchungsergebnisse in Bezug auf den Abortmonat

Fall	Abort monat	ELISA LGL	ELISA FLI	WESTERN BLOT
41	4	POS	NEG	NEG
221	5	NEG	-	-
1143	5	-	-	-
270	5	POS	-	-
304	6	POS	POS	POS
477	6	POS	POS	POS
478	6	POS	NEG	NEG
239	7	POS	POS	POS
255	7	POS	-	-
273	7	POS	-	-
418	7	-	-	-
419	7	-	-	-
585	7	NEG	NEG	NEG
805	7	NEG	POS	NEG
3	7	FRAG	NEG	NEG
101	7	POS	NEG	FRAG
170	7	NEG	NEG	NEG
980	8	NEG	NEG	NEG
1128	8	POS	-	-
112	8	NEG	NEG	NEG
148	8	-	-	-
241	9	POS	-	-
797	9	POS	POS	POS

Legende: - nicht möglich, da keine Flüssigkeit
bei der Sektion zu gewinnen war

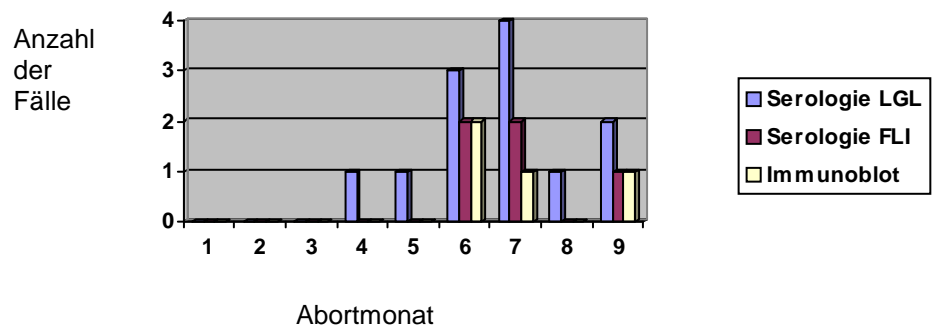


Abb. 27: Graphische Darstellung der serologischen Untersuchungsergebnisse in Bezug auf den Abortmonat

Aus der Graphik kann keine Korrelation zwischen Gestationsalter und Antikörnernachweis im Blut ermittelt werden. Aufgrund der geringen Probenzahl und der häufigen Abweichungen ist praktisch keine Aussage möglich.

Um ein seropositives oder seronegatives Ergebnis sicher interpretieren zu können sind weitere epidemiologische Informationen erforderlich (PARÉ et al., 1995).

Eine zusätzliche histologische Untersuchung des Abortmaterials und Fetus ist notwendig (OTTER et al., 1997).

5.4 Bedeutung als Aborterreger

Die pathogenetische Rolle von *Neospora caninum* in Bezug auf Aborte wird kontrovers diskutiert (HEMPHILL et al., 2000). Einige Forscher sind der Meinung, dass die Anwesenheit von *Neospora caninum* bei Feten eher zufällig ist und nur die Anwesenheit einer Infektion im Muttertier reflektiert (THURMOND et al., 1997 und 1999).

In Bezug auf *Neospora caninum* lassen spezielle pathologisch-anatomische Veränderungen bereits einen Verdacht auf die Infektion mit diesem Parasiten zu. Charakteristisch sind vor allem eine multifokale Enzephalitis und eine multifokale nicht-eitrige Myokarditis (ANDERSON et al., 1991; BARR et al., 1990; NIETFIELD et al., 1992; OTTER et al., 1995).

Daneben finden sich in vielen anderen Organen wie u.a. Herz, Leber, Lunge, Niere, Skelettmuskel und Plazenta entzündliche Läsionen (BARR et al., 1990; ROGERS et al., 1993).

Die Histopathologie ist die einzige Disziplin die eine Aussage über den Schweregrad der Läsionen im Fetus zulässt. Auch haben Pathologen die Erfahrung, dass abortierte Feten, die mit *Neospora caninum* infiziert sind, in vielen Organen weit gestreute zelluläre Infiltrate und Nekroseareale aufweisen (WOUDA et al., 1997). Ihre Argumentation besagt, dass die Schwere und das Ausmaß der Läsionen den fetalen Tod und damit den Abort verursachen, der durch experimentelle Infektionen von tragenden Kühen bestätigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wiesen 13 Fälle starke Veränderungen am Gehirn (nicht-eitrige Enzephalitis) auf. In 17 Fällen konnten starke Alterationen am Herzen (Epi- und Myokarditis) beobachtet werden. Diese Läsionen waren so deutlich, dass davon ausgegangen werden kann, dass sie allein das Absterben des Fetus und den Abort verursacht haben.

In 10 Fällen waren keine oder nur geringe Veränderungen zu beobachten. Da 6 dieser Fälle bereits in einem autolytischen Zustand und zwei weitere mumifiziert waren, konnte die Abortursache nicht eindeutig beurteilt werden.

Bei 7 der 10 Fälle, die histologisch negativ bewertet wurden, lag jedoch bei der Untersuchung mit PCR Methoden ein positives Ergebnis vor. Außerdem gab es 2 Fälle, die histologisch ebenfalls ein negatives und serologisch jedoch ein positives Ergebnis erbrachten.

In diesen Fällen muss berücksichtigt werden, dass auch andere pathogenetische Mechanismen, z.B. immunologischer Natur oder Sekundär- / Begleitinfektionen den fetalen Tod verursacht haben können.

Wäre in diesen Fällen jedoch nur eine histologische Untersuchung durchgeführt worden, so hätten sich diese Fälle der Detektion entzogen.

Im Hinblick auf Doppel- und Sekundärinfektionen konnten in unserer Studie in 6 der 23 *Neospora caninum*-positiven Fälle Mischinfektionen beobachtet werden. Auch hier stellt sich die Frage, ob *Neospora caninum* selbst zum Abort führte oder ob der Parasit nur als Wegbereiter für andere Aborterreger diente.

Bei den beiden Doppelinfektionen mit *Arcanobacterium pyogenes* ist die Bedeutung der bakteriellen Erreger unklar. In einem der beiden Fälle ist *Neospora caninum* als Aborterreger durchaus in Betracht zu ziehen, da die histologischen Veränderungen sehr charakteristisch für *Neospora caninum*-Infektionen sind (nicht-eitrige Enzephalitis und Myokarditis). In dem anderen Fall sprechen die Veränderungen (eitrige Pneumonie und starkes Wachstum von *Arcanobacterium pyogenes* in allen fetalen Organen) eher für einen Abort infolge einer *Arcanobacterium pyogenes*-Infektion.

Auch bei dem Fall mit starkem Wachstum von *Pasteurella aerogenes* auf fetalen Organen ist eine Beteiligung von *Neospora caninum* in Betracht zu ziehen, da auch in diesem Fall sehr charakteristische Veränderungen wie eine nicht-eitrige Enzephalitis, eine nicht-eitrige Epi- und Myokarditis sowie lymphoplasmazelluläre Infiltrate in der Skelettmuskulatur zu beobachten waren. Zusätzlich erbrachte der ELISA auf *Neospora caninum* in der fetalen Bauchhöhlenflüssigkeit in diesem Fall ein positives Ergebnis.

In dem Fall der Doppelinfektion mit *Listeria monocytogenes* wurde die Diagnose durch fortgeschrittene Autolyse erschwert. Der ELISA auf *Neospora caninum* im fetalen Blut zeigte zwar ein positives Ergebnis, aber aufgrund des schlechten Erhaltungszustandes des Fetus ist die Bedeutung der beiden Erreger nicht eindeutig beurteilbar. In dem Fall der Mischinfektion mit *Bacillus licheniformis* sprechen alle Befunde (hochgradige multifokale nekrotisierende Enzephalitis, Nachweis von Parasitenstadien von *Neospora caninum*, multifokale Herzmuskelnekrosen) sehr stark für ein Abortgeschehen infolge einer Infektion mit *Neospora caninum*.

Auch bei dem Fall, bei dem *E. coli* nahezu in Reinkultur angezüchtet werden konnte, erschwerte sich die Diagnose aufgrund des autolytischen Zustandes des Fetus. Die Befunde sprechen eher für einen bakteriell bedingten Abort. Allein die Real Time TaqMan-Sondentechnik lieferte ein positives Untersuchungsergebnis.

Abschließend kann festgestellt werden, dass der genaue Pathomechanismus des *Neospora caninum* assoziierten Aborts bislang noch nicht bekannt ist. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es bei sehr deutlichen Läsionen zum Absterben des Fetus und zum Abort kommt, während bei geringen Veränderungen andere pathogenetische Mechanismen, z.B. immunologischer Natur oder Sekundär-/Begleitinfektionen den fetalen Tod verursachen. Der Nachweis *Neospora caninum* bedingter Alterationen in einem abortierten Fetus bedeutet also nicht, dass *Neospora caninum* ursächlich und allein für den Abort verantwortlich zu machen ist. Zudem ist eine Vielzahl an Doppelinfektionen mit anderen Aborterregern beschrieben.

Aus diesem Grund sind stets weitere Abortursachen auszuschließen (SCHARES et al., 2007).

Aus der Literatur sind auch transplazentar mit *Neospora caninum* infizierte, klinisch gesund geborene Kälber bekannt, bei denen histologisch fokale entzündliche Läsionen im zentralen Nervensystem vorlagen (SCHARES et al., 2007).

Zusammenfassung

Beteiligung von *Neospora caninum* bei Rinderaborten in Nordbayern

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen und die mögliche Bedeutung von *Neospora caninum* als Aborterreger in nordbayerischen Rinderherden zu ermitteln. Dabei sollten die am LGL Erlangen zur Verfügung stehenden Nachweismethoden bezüglich ihrer Effektivität miteinander verglichen werden.

Es sollte herausgefunden werden, welche Methode oder welche Kombination von Methoden für die Anwendung in der Routine-Diagnostik am sinnvollsten erscheint.

Für diesen Zweck wurden alle binnen eines Jahres ans LGL Erlangen eingesandten Abortfälle (232 Fälle) mit verschiedenen direkten und indirekten Methoden untersucht. Zu den direkten Methoden zählten die Histopathologie, Immunhistochemie und die Polymerase Ketten Reaktion (PCR). Bei den indirekten Methoden kamen die ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)- Methodik und der Western Blot zum Einsatz.

Es reagierten 23 der 232 untersuchten Proben zumindest mit einer Methode positiv. Das bedeutet, dass *Neospora caninum* also an ca. 10% der Aborte in Nordbayern beteiligt ist. Ob *Neospora caninum* dabei als Hauptursache des Aborts oder als Wegbereiter für weitere Erreger agiert, konnte nicht immer zweifelsfrei geklärt werden.

Mittels Routine-Histologie (Paraffineinbettung, H.E.-Färbung) konnten Verdachtsfälle aufgrund charakteristischer morphologischer Veränderungen insbesondere in Gehirn und Herz erkannt werden. Die histopathologischen Läsionen bestanden überwiegend in einer multifokal nekrotisierenden Enzephalitis und einer nicht eitrigen, von Makrophagen dominierten Myokarditis. Die meisten dieser Verdachtsfälle konnten durch immunhistologische Anfärbung des Erregers mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers bestätigt werden. Aufgrund der oft geringen Erregerzahl waren in einigen Fällen mehrere (bis zu vier) immunhistologische Läufe notwendig, um den Erreger im Schnitt sicher darstellen zu können. Bei starker Autolyse, insbesondere in den Fällen, in denen mumifizierte Feten eingesandt wurden, konnte die Histologie nur mit Einschränkung, die Immunhistologie überhaupt nicht mehr eingesetzt werden.

Mittels PCR war es jedoch auch in diesen Fällen möglich, Erreger-DNA nachzuweisen. Insgesamt erbrachte die PCR die meisten positiven Ergebnisse. Dabei konnten mit den drei verschiedenen Techniken (klassische PCR mit Agarosegel, Real Time PCR mit SYBR Green, Real Time PCR mit TaqMan Sonde) annähernd gleiche Ergebnisse erzielt werden; die Real Time PCR mit TaqMan Sonden Technik war den anderen beiden Methoden leicht überlegen. Ein Nachteil der PCR ist der hohe Kostenaufwand. Auch ermöglicht die PCR allein keine Aussage über die Bedeutung von *Neospora caninum* als Abortursache für den betreffenden Verwerfensfall und sollte daher unbedingt mit einer morphologischen Methode (Histologie) kombiniert werden.

Die serologische Untersuchung auf Antikörper gegen *Neospora*

caninum in fetalen Körperhöhlenflüssigkeiten erwies sich von eingeschränktem Nutzen. Feten in frühen Trächtigkeitsstadien entwickeln zum Teil noch keine spezifischen Antikörper, so dass sich in 3 Fällen trotz deutlicher morphologischer Veränderungen als seronegativ herausstellten. Demgegenüber gab es 4 Fälle, die keinerlei pathomorphologische Läsionen aufwiesen und seropositiv reagierten. Eine klare Interpretation derartiger Abortfälle ist nicht möglich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich für den Nachweis einer Beteiligung von *Neospora caninum* am Abortgeschehen am besten eine Kombination histologischer Methoden mit der PCR eignet. Mit Hilfe der Histopathologie können Verdachtsfälle ermittelt werden; der ursächliche Erreger kann anschließend im positiven Fall mittels PCR bestätigt werden. Außerdem besitzt die PCR die höchste Sensitivität aller getesteten Systeme und kann so am sichersten Fälle aufdecken, bei denen der Erreger, auch ohne Läsionen in den Geweben zu setzen, beteiligt ist.

Summary

Participation of *Neospora caninum* in abortions in cattle populations in Northern Bavaria

Stated aim of this study was to investigate the incidence and the potential importance of *Neospora caninum* as a cause of abortion in cattle populations in Northern Bavaria. For this purpose the available diagnostic methods of the LGL in Erlangen were compared with each other relating to their efficiency. Aim was to find out which method or which combination of methods is most useful in the routine diagnosis.

To serve this purpose, all abortion cases which were sent in for analysis to the LGL Erlangen (232 cases) within a year (2005-2006) were tested with different direct and indirect methods.

Direct diagnosis of the infection was determined by histopathology, immunohistochemistry and PCR (polymerase chain reaction).

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) and Western Blot were used for indirect analysis.

23 of the 232 cases were considered to be infected by at least one of the diagnostic techniques used. That implies that *Neospora caninum* is involved in 10% of abortions in Northern Bavaria. It's impossible to prove beyond doubt if *Neospora caninum* is the main cause of abortions or an innovator for further infections.

Suspicious cases could be identified by routine histopathology because of characteristic lesions – particularly in brain and heart. Typical histological lesions consisted overbalancing in multifocal nonsuppurative necrotizing encephalitis and non-purulent myocarditis. Most of these cases were confirmed by immunohistochemical staining with using a polyclonal antibody.

Frequently low numbers of disease agents necessitate more (up to 4) immunohistochemical runs in some cases to verify the agent. Especially in cases of bold autolysis or mummified fetuses histology was applicable only with restrictions, Immunohistochemistry not at all.

PCR is able to detect DNA of the parasite in these cases. Altogether the PCR got the most positive results.

In cause of this three different techniques (conventionell PCR, Real Time SYBR Green, Real Time TaqMan) could adduce approximately same results. The Real Time TaqMan Technique gained slightly advantage over the two other methods. High costs and difficulties to take positive results are detriments of the PCR-method. There is no qualified statement about the importance of *Neospora caninum* as a cause of abortion, using the PCR method only. Therefore the PCR method should be combined with one additionally morphological method.

Serological tests of *Neospora caninum* intrinsic antibodies in fetal fluids proved not to be very useful. Fetuses in early pregnancy develop partly no specific antibodies against *Neospora caninum* so that these cases were seronegative in spite of showing typical morphological lesions. Compared with this, 4 seropositive cases did not show any histopathological alterations. A final interpretation of such cases is impossible.

Summarising this study confirms the importance of *Neospora caninum* as a cause of abortion in Northern Bavaria and underlines the need to use different diagnostic techniques to increase the chance to detect the infection in aborted fetuses.

The best combination is histopathology with PCR. After a screening with histopathology, suspicious fetal tissues should be verified by PCR. Furthermore the PCR has got the highest sensitivity of all used methods. It is able to detect also cases without lesions although inspite of presenting the parasit.

PCR was confirmed to be the best tool for the diagnosis of *Neospora caninum* in aborted fetuses.

Literaturverzeichnis

Agerholm, J.S.; Willadsen, C.M.; Nielsen, T.K.; Giese, S.B.; Holm, E.; Jensen, L.; Agger, J.F. (1997):
Diagnostic Studies of Abortion in Danish Dairy Herds.
J. Vet. Med. A. 44, 551-558

Ahlers, D. und Grunert, E. (1997):
Aborte beim Rind- diagnostische Maßnahmen und Forensik
Prakt. Tierarzt 78: 8, 674- 685

Alvarez-Garcia G, Pereira-Bueno J, Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM(2002):
Pattern of recognition of Neospora caninum tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses.
Vet Parasitol. 2002 Jul 29;107(1-2):15-27.

Ahne, W. (2000):
Systematische Zoologie
In: Zoologie. 1. Auflage: 169-303
Schattauer Verlag Stuttgart, New York

Anderson, B.C. (2000):
Contamination of feedstuffs caused by farm dogs.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 217, 1294

Anderson, M.L.; Blanchard, P.C.; Barr, B.C.; Dubey, J.P.; Hoffmann, R.L.; Conrad, P.A. (1991):
Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 198, 241-244

Anderson, M.L.; Palmer, C.W.; Thurmond, M.C.; Picanso, J.P.; Blanchard, P.C.; Breitmeyer, R.E.; Layton, A.W.; McAllister, M.; Daft, B.; Kinde, H.; Read, D.H.; Dubey, J.P.; Conrad, P.A.; Barr, B.C. (1995):
Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 207, 1206-1210

Anderson, M.L.; Reynolds, J.P.; Rowe, J.D.; Sverlow, K.W.; Packham, A.E.; Barr, B.C.; Conrad, P.A. (1997):
Evidence of vertical transmission of Neospora sp. infection in dairy cattle.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 210, 1169-1172

Anderson, M.L.; Andrianarivo, A.G.; Conrad, P.A. (2000):
Neosporosis in cattle.
Anim. Reprod. Sci. 60-61, 417-431

Atkinson, R.; Harper, P.A.W.; Reichel, M.P.; Ellis, J.T. (2000):
Progress in the Serodiagnosis of Neospora caninum Infections of Cattle.
Parasitol. Today 16, 110-114

Barling, K.S.; Lunt, D.K.; Snowden, K.F.; Thompson, J.A. (2001b):
Association of serologic status for Neospora caninum and postweaning feed efficiency in beef steers.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 219, 1259-1262

Barr, B.C.; Anderson, M.L.; Blanchard, P.C.; Daft, B.M.; Kinde, H.; Conrad, P.A. (1990):
Bovine Fetal Encephalitis and Myocarditis Associated with Protozoal Infections.
Vet. Pathol. 27, 354-361

- Barr, B.C.; Anderson, M.L.; Dubey, J.P.; Conrad, P.A. (1991a):
Neospora-like Protozoal Infections Associated with Bovine Abortions.
Vet. Pathol. 28, 110-116
- Barr, B.C.; Conrad, P.A.; Dubey, J.P.; Anderson, M.L. (1991b):
Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure and immunoreactivity.
J. Vet. Diagn. Invest. 3, 39-46
- Barr, B.C.; Conrad, P.A.; Breitmeyer, R.; Sverlow, K.; Anderson, M.L.; Reynolds, J.; Chauvet, A.E.; Dubey, J.P.; Ardans, A.A. (1993):
Congenital Neospora. infection in calves born from cows that had previously aborted Neospora-infected fetuses: Four cases (1990-1992).
J. Am. Vet. Med. Assoc. 202, 113-117
- Barr, B.C.; Conrad, P.A.; Sverlow, K.W.; Tarantal, A.F.; Hendrickx, A.G. (1994a):
Experimental Fetal and Transplacental Neospora Infection in the Nonhuman Primate.
Lab. Inv. 71, 236-242
- Barr, B.C.; Rowe, J.D.; Sverlow, K.W.; BonDurant, R.H.; Ardans, A.A.; Oliver, M.N.; Conrad, P.A. (1994b):
Experimental reproduction of bovine fetal Neospora. infection and death with a bovine Neospora isolate.
J. Vet. Diagn. Invest. 6, 207-215
- Barr, B.C.; Anderson, M.L.; Sverlow, K.W.; Conrad, P.A. (1995):
Diagnosis of bovine fetal Neosporosis infection with an indirect fluorescent antibody test.
Vet. Rec. 137, 611-613
- Barta, J.R. und Dubey, J.P. (1992):
Characterization of anti-Neospora. caninum. hyperimmune rabbit serum by Western blot analysis and immunoelectron microscopy.
Parasitol. Res. 78, 689-694
- Bartels, C.J.M.; Wouda, W.; Schukken, Y.H. (1999):
Risk for Neospora. caninum-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997).
Theriogenology 52, 247-257
- Bartley PM, Kirvar E, Wright S, Swales C, Esteban-Redondo I, Buxton D, Maley SW, Schock A, Rae AG, Hamilton C, Innes EA.(2004):
Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with Neospora caninum at mid-gestation.
J Comp Pathol. 2004 Feb-Apr;130(2-3):81-91.
- Basso, W.; Venturini, L.; Venturini, M.C. (2001):
First isolation of Neospora caninum from the feces of a naturally infected dog.
Parasitol. 87, 612-618
- Baszler, T. V.; Gay, L. J.C.; Long, M.T.; Mathison, B.A.; (1999):
Detection by PCR of Neospora caninum in Fetal Tissues from Spontaneous Bovine Abortions
J. Clin. Microbiol. , Dec. 1999, 4059-4064
- Baszler, T. (2003):
Bovine Neosporosis
http://www.vetmed.wsu.edu/depts_waddl/Neosporosis.asp
- Bell, A.S.; Ranford, C.; Lisa, C. (2002):
Real-time quantitative PCR in parasitology.
Trends Parasitol. 18, 337-342

- Bjerkås, I.; Mohn, S.F.; Presthus, J. (1984):
Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs.
Z. Parasitenk. 70, 271-274
- Bjerkås, I. und Presthus, J. (1988):
Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs.
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. 96, 445-454
- Bjerkås, I. und Presthus, J. (1989):
The neuropathologie in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs.
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. 97, 459-468
- Bjerkås, I.; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1994):
Identification and Characterization of Neospora. caninum Tachyzoite Antigens Useful for Diagnosis of Neosporosis.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1, 214-221
- Björkman, C.; Lundén, A.; Holmdahl, J.; Barber, J.; Trees, A.J.; Uggla, A. (1994a):
Neospora caninum in Dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen.
Parasite Immunol. 16, 643-648
- Björkman, C.; Johansson, O.; Stenlund, S.; Holmdahl, O.J.M.; Uggla, A. (1996):
Neospora species infection in a herd of dairy cattle.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 208, 1441-1444
- Björkman, C. und Uggla, A. (1999):
Serological diagnosis of Neospora caninum infection.
Int. J. Parasitol. 29, 1497-1507
- Björkman, C.; Alenius, S.; Emanuelsson, U.; Uggla, A. (2000):
Neospora. caninum and Bovine Virus Diarrhoea Virus Infections in Swedish Dairy Cows in Relation to Abortion.
Vet. J. 159, 201-206
- Boger, L.A. (2006):
A short review of Neospora caninum
<http://vetextension.psu.edu/Newsletters/Diagnostic/hhm11004.htm>
Datum: 04.04.2006
- Boulton, J.G.; Gill, P.A.; Cook, R.W.; Fraser, G.C.; Harper, P.A.W.; Dubey, J.P. (1995):
Bovine Neospora abortion in north-eastern New South Wales.
Aust. Vet. J. 72, 119-120
- Buffone GJ, Darlington GJ. (1985):
Isolation of DNA from biological specimens without extraction with phenol.
Clin Chem. 1985 Jan;31(1):164-5. No abstract available
- Buxton, D.; Caldow, G.L.; Maley, S.W.; Marks, J.; Innes, E.A. (1997a):
Neosporosis and bovine abortion in Scotland.
Vet. Rec. 141, 649-651
- Buxton, D.; Maley, S.W.; Thomson, K.M.; Trees, A.J.; Innes, E.A. (1997b):
Experimental Infection of Non-pregnant and Pregnant Sheep with Neospora caninum.
J. Comp. Path. 117, 1-16
- Buxton, D.; Maley, S.W.; Pastoret, P.P.; Brochier, B.; Innes, E.A. (1997c):
Examination of red foxes (Vulpes vulpes) from Belgium for antibody to Neospora caninum and Toxoplasma gondii.
Vet. Rec. 141, 308-309

- Buxton, D.; McAllister, M.M.; Dubey, J.P. (2002):
The comparative pathogenesis of neosporosis.
Trends Parasitol. 18, 546-552
- Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W.(1997):
DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA.
Biotechniques. 1997 Mar;22(3):550-3.
- Collantes-Fernández E, Zaballo A, Alvarez-García G, Ortega-Mora LM
Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR
J Clin Microbiol. 2002 Apr;40(4):1194-8.
- Collery, P. M. (1996):
Neosporosis in domestic animals.
Irish Vet. J. inc. Irish Vet. Times 49, 152-156
- Conrad, P.A.; Barr, B.C.; Sverlow, K.W.; Anderson, M.; Daft, B.; Kinde, H.; Dubey, J.P.; Munson, L.; Ardans, A. (1993a):
In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses.
Parasitology 106, 239-249
- Conraths, F.J.; Bauer, C.; Becker, W. (1996):
Nachweis von Antikörpern gegen *Neospora caninum* bei Kühen in hessischen Betrieben mit Abort- und Fruchtbarkeitsproblemen.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 103, 221-224
- Conraths, F.J. und Schares, G. (1999):
Diagnostik und Epidemiologie *Neospora caninum*-assoziierter Aborte beim Rind.
Tierärztl. Prax. 27 (G), 145-153
- Conraths, F.J. und Schares, G. (2000):
Neospora caninum: 1-5
<http://www.dainet.de/bfav/organisation/ifed/krankheiten/neospora1.html/>
1.11.2001
- Conraths, F.J. und Schares, G. (2004):
Diagnostik und Epidemiologie *Neospora caninum* assoziierter Verkalbungen beim Rind
<http://www.bfav.de/organisation/ifed/krankheiten/neospora1.html>.
25.07.2004, S.1-5
- Corbellini, L.G.; Driemeier, D.; Cruz, C.F.E.; Gondim, L.F.P.; Wald, V. (2002):
Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil.
Vet. Parasitol. 103, 195-202
- Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N., Ghosh, A.K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K.A.F., Stein, H., Mason, D.Y. (1984):
Immunochemical labeling of monoclonal antibodies using immun-complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)
J. Histochem. Cytochem. 32, 219-229
- Cox, F.E.G. (1994):
The evolutionary expansion of the Sporozoa.
Int. J. Parasitol. 24, 1301-1316
- Cox, R.A. (1968):
The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids
Methods Enzymol. 12B: 120-129

- Cummings, J.F., De Lahunta, A., Suter, M.M., Jacobson, R.H. (1988):
Canine protozoan polyradiculoneuritis
Acta. Neuropathol. (Berl.) 76, 46-54
- Dannat, L.; Guy, F.; Trees, A.J. (1995):
Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd.
Vet. Rec. 137, 566-567
- Davison, H. C.; French, N.P.; Trees, A.J. (1999a):
Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds.
Vet. Rec. 144, 547-550
- Davison, H.C.; Guy, F.; Trees, A.J.; Ryce, C.; Ellis, J.T.; Otter, A.; Jeffrey, M.; Simpson, V.R.; Holt, J.J. (1999b):
In vitro isolation of *Neospora caninum* from a stillborn calf in the UK.
Res. Vet. Sci. 67, 103-105
- Davison, H.C.; Otter, A.; Trees, A.J. (1999c):
Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle.
Int. J. Parasitol. 29, 1683-1689
- Davison, H.C.; Otter, A.; Trees, A.J. (1999d):
Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle.
Int. J. Parasitol. 29, 1189-1194
- Davison HC, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Williams DJ, Kelly DF, Trees AJ (2001):
Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle
Res. Vet. Sci 70 (2): 163- 168
- De Kruif, A. (1993):
Störungen der Graviditätsdauer.
In: Tiergeburtschilfe, 4. Auflage: 190-212
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, Grunert, E. und Arbeiter, K. (Hrsg.)
- De Marez, T.; Liddell, S.; Dubey, J.P.; Jenkins, M.C.; Gasbarre, L. (1999):
Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular responses.
Int. J. Parasitol. 29, 1647-1657
- De Meerschmann, F.; Speybroeck, N.; Berkvens, D.; Rettigner, C.; Focant, C.; Leclipteux, T.; Cassart, D.; Losson, B. (2002):
Fetal Infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium.
Theriogenology 58, 933-945
- Dijkstra, T.; Barkema, H.W.; Eysker, M.; Wouda, W. (2001a):
Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds.
Int. J. Parasitol. 31, 209-215
- Dijkstra, T.; Eysker, M.; Schares, G.; Conraths, F.J.; Wouda, W.; Barkema, H.W. (2001b):
Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites.
Int. J. Parasitol. 31, 747-752
- Dijkstra, T.; Barkema, H.W.; Björkman, C.; Wouda, W. (2002):
A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions.
Vet. Parasitol. 109, 203-211

- Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W. (2003):
Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies.
Vet Parasitol. 2003 Jan 2;110(3-4):161-9.
- Dubey J.P. (1999a):
Recent advances in *Neospora* and Neosporosis.
Vet. Parasitol. 84, 349-367
- Dubey, J.P. (1999b):
Neosporosis-the first decade of research.
Int. J. Parasitol. 29, 1485-1488
- Dubey, J.P. (1999c):
Neosporosis in cattle: biology and economic impact.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 214, 1160-1163
- Dubey, J.P. (2003):
Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals.
Korean J. Parasitol. 41, 1-16
- Dubey, J.P. und Beattie, C.P. (1988):
Toxoplasmosis in cattle (*Bos taurus*).
In: Toxoplasmosis of animals and man. 1. Edition, 30-33, 107-115, 220
Boca Raton, FL: CRC Press
- Dubey, J.P.; Carpenter, J.L.; Speer, C.A.; Topper, M.J.; Uggla, A. (1988a):
Newly recognized fatal protozoan disease of dogs.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 192, 1269-1285
- Dubey, J.P. und Lindsay, D.S. (1989a):
Transplacental *Neospora caninum* infection in cats.
J. Parasitol. 75, 765-771
- Dubey, J.P. und Lindsay, D.S. (1989b):
Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs.
Am. J. Vet. Res. 50, 1578-1579
- Dubey JP, und Lindsay DS (1996):
A review of *Neospora caninum* and neosporosis.
Vet Parasitol.;67(1-2):1-59.
- Dubey, J.P. und Porterfield, M.L. (1990):
Neospora caninum (Apicomplexa) in an Aborted Equine Fetus.
J. Parasitol. 76, 732-734
- Dubey, J.P.; Hartley, W.J.; Lindsay, D.S.; Toppert, M.J. (1990b):
Fatal Congenital *Neospora caninum* Infection in a Lamb.
J. Parasitol. 76, 127-130
- Dubey, J.P.; Koestner, A.; Piper, R. C. (1990c):
Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 857-860
- Dubey, J.P.; Miller, S.; Lindsay, D.S.; Topper, M.J. (1990e):
Neospora caninum-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf.
J. Vet. Diagn. Invest. 2, 66-69
- Dubey, J.P. und Rommel, M. (1992):
Durch Protozoen bedingte Aborte bei landwirtschaftlichen Nutztieren.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 99, 355-362

- Dubey, J.P.; Acland, H.M.; Hamir, A.N. (1992a):
Neospora caninum (Apicomplexa) in a Stillborn Goat.
J. Parasitol. 78, 532-534
- Dubey, J.P.; Janovitz, E.B.; Skowronek, A.J. (1992b):
Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf.
Vet. Parasitol. 43, 137-141
- Dubey, J.P. und DeLahunta, A. (1993):
Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf.
Appl. Parasitol. 34, 229-233
- Dubey, J.P. und Lindsay, D. S. (1993):
Neosporosis.
Parasitol. Today 9, 452-458
- Dubey, J. P. und Lindsay, D.S. (1996):
A review of *Neospora caninum* and neosporosis.
Vet. Parasitol. 67, 1-59
- Dubey, J.P.; Rigoulet, J.; Lagourette, P.; George, C.; Longeart, L.; LeNet, J.L.
(1996b):
Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*).
J. Parasitol. 82, 338-339
- Dubey JP, Jenkins MC, Adams DS, McAllister MM, Anderson-Sprecher R, Baszler TV,
Kwok OC, Lally NC, Bjorkman C, Uggla A.
Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect
fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays.
J Parasitol. 1997 Dec;83(6):1063-9.
- Dubey, J.P.; Abbitt, B.; Topper, M.J.; Edwards, J.F. (1998a):
Hydrocephalus Associated with *Neospora caninum* Infection in an Aborted Bovine
Fetus.
J. Comp. Path. 118, 169-173
- Dubey, J.P.; Hollis, K.; Romand, S.; Thulliez, P.; Kwok, O.C.H.; Hungerford, L.;
Anchor, C.; Etter, D. (1999a):
High prevalence of antibodies to *Neospora. caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus
virginianus*).
Int. J. Parasitol. 29, 1709-1711
- Dubey, J.P.; Venturini, M.C.; Venturini, L.; McKinney, J.; Pecoraro, M. (1999b):
Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora
caninum* in horses from Argentina.
Vet. Parasitol. 86, 59-62
- Dubey, J.P.; Romand, S.; Thulliez, P.; Kwok, O.C.H.; Shen, S.K.; Gamble, H.R.
(1999c):
Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America.
J. Parasitol. 85, 968-969
- Dubey, J.P.; Kerber, C.E.; Ganstrom, D.E. (1999d):
Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora
caninum* in Brazil.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 15, 970-972
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM.(2007):
Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*.
Clin Microbiol Rev. 2007 Apr; 20(2):323-67. Review

- Edelhofer, R. (2001):
Neosporose
2. Alpbacher Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Tierärzte
- Eickbush TH, Moudrianakis EN.
The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids.
Cell. 1978 Feb;13(2):295-306.
- Ellis, J.T. (1999):
Gene discovery and prospects for Vaccination against *N. caninum*.
Proceedings COST-Action 820 Workshop on .Vaccines against animal coccidiosis..
Interlaken, Switzerland, Gottstein, B. und Hemphill, A. (Ed.)
- Ellis, J.T.; Luton, K.; Baverstock, P.R.; Brindley, P.J.; Nimmo, K.A.; Johnson, A.M. (1994):
The Phylogeny of *Neospora caninum*.
Mol. Biochem. Parasitol. 64, 303-311
- Ellis, J.T.; Amoyal, G.; Ryce, C.; Harper, P.A.W.; Clough, K.A.; Homan, W.L.; Brindley, P.J. (1998):
Comparison of the large subunit ribosomal DNA of *Neospora*. and *Toxoplasma*. and development of a new genetic marker for their differentiation based on the D2 domain.
Mol. Cell. Probes 12, 1-13
- Ellis, J.T.; McMillan, D.; Ryce, C.; Payne, S.; Atkinson, R.; Harper, P.A.W. (1999):
Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA.
Int. J. Parasitol. 29, 1589-1596
- Ferroglio, E. und Rossi, L. (2001):
Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in wild ruminants from Italian Alps.
Vet. Rec. 148, 754-755
- Ferre I, Aduriz G, Del-Pozo I, Regidor-Cerrillo J, Atxaerandio R, Collantes-Fernandez E, Hurtado A, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM (2005):
Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls.
Theriogenology. 2005 Mar 15;63(5):1504-18.
- Frey, H.R. (1997a):
Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis.
In: Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere. 1. Auflage: 33-34
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Liess, B. (Hrsg.)
- Frey, H.R. (1997b):
Infektiöse Bovine Rhinotracheitis.
In: Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere. 1. Auflage: 38-40
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Liess, B. (Hrsg.)
- Gedek, B.; Kaaden, O.R.; Mahnel, H.; Mayr, A. (1993):
Spezielle Bakteriologie und Mykologie.
In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 6. Auflage: 536-870
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Mayr, A. (Hrsg.)
- Gondim, L.F.P.; Pinheiro, A.M.; Santos, P.O.M.; Jesus, E.E.V.; Ribeiro, M.B.; Fernandes, H.S.; Almeida, M.A.O.; Freire, S.M.; Meyer, R.; McAllister, M.M. (2001):
Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils.
Vet. Parasitol. 101, 1-7

- Gondim, L.F.P.; Gao, L.; McAllister, M.M. (2002):
Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts.
J. Parasitol. 88, 1159-1163
- Gondim LF, Gao L, McAllister MM.(2002):
Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts.
J Parasitol. 2002 Dec;88(6):1159-63.
- Gondim LF, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Bjorkman C, Lock TF, Firkins LD, Gao L, Fischer WR.
Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts.
J Parasitol. 2004 Dec;90(6):1394-400
- González, L.; Buxton, D.; Atxaerandio, R.; Aduriz, G.; Maley, S.; Marco, J.C.; Cuervo, L.A. (1999):
Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain.
Vet. Rec. 144, 145-150
- Gordon JA.(1972):
Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins.
Biochemistry. 1972 May 9;11(10):1862-70. No abstract available.
- Gottstein, B.; Hentrich, B.; Wyss, R.; Thür, B.; Busato, A.; Stärk, K.D.C.; Müller, N. (1998):
Molecular and immundiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland.
Int. J. Parasitol. 28, 679-691
- Gottstein, B.; Hentrich, B.; Wyss, R.; Thür, B.; Bruckner, L.; Müller, N.; Kaufmann, H.; Waldvogel, A. (1999):
Molekular- und immundiagnostische Untersuchungen zur bovinen Neosporose in der Schweiz.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 141, 59-68
- Graham, D.A.; Calvert, V.; Whyte, M.; Marks, J. (1999):
Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection.
Vet. Rec. 144, 672-673
- Guesdon, J.L., Ternynck, T. , Avrameas, S. (1979):
The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques
J. Histochem. Cytochem. 27, 1131- 1139
- Guo, Z.G. und Johnson, A.M. (1995):
Genetic comparison of *Neospora. caninum* with *Toxoplasma. and Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction.
Parasitol. Res. 81, 365-370
- Hässig, M.; Eggenberger, E.; Künzle, S.; Rüsch, P. (1991):
Überprüfung der Bestandesberatung in Betrieben mit gehäuftem Verwerfen beim Rind.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 142, 55-64
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT.(2005):
Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control.
Vet Parasitol. 2005 Mar 31;128(3-4):231-41.
- Hamaguchi K. und Geiduschek E.P. (1962):
The effect of electrolytes on the stability of the desoxyribonucleate helix
J. Am. Chem. Soc. 84 (8): 1329-1338

- Harder, T.C. (1997):
Rinderpest.
In: Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere. 1. Auflage: 26-28
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Liess, B. (Hrsg.)
- Hattel, A.L.; Castro, M.D.; Gummo, J.D.; Weinstock, D.; Reed, J.A.; Dubey, J.P.
(1998):
Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania.
Vet. Parasitol. 74, 307-313
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996):
Real time quantitative PCR.
Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94.
- Heil-Franke, G.; Plagemann, O.; Singer, H. (1993):
Virologische und bakteriologische Untersuchungsergebnisse von abortierten
Rinderfeten aus Nordbayern.
Tierärztl. Umschau 48, 16-20
- Helmick, B.; Otter, A.; McGarry, J.; Buxton, D. (2002):
Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora*
caninum.
Res. Vet. Sci. 73, 187
- Hemphill, A. (1999):
The Host-Parasite relationship in Neosporosis.
Adv. Parasitol. 43, 47-104
- Hemphill, A. und Gottstein, B. (1996):
Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites.
Parasitol. Res. 82, 497-504
- Hemphill, A.; Gottstein, B.; Kaufmann, H. (1996):
Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*.
Parasitology 112, 183-197
- Hemphill, A.; Fuchs, N.; Sonda, S.; Hehl, A. (1999):
The antigenic composition of *Neospora caninum*.
Int. J. Parasitol. 29, 1175-1188
- Hemphill, A.; Gottstein, B.; Conraths, F.J.; De Meerschmann, F.; Ellis, J.T.; Innes,
E.A.; McAllister, M.M.; Ortega-Mora, L.M.; Tenter, A.M.; Trees, A.J.; Uggla, A.;
Williams, D.J.L.; Wouda, W. (2000a):
A European perspective on *Neospora caninum*.
Int. J. Parasitol. 30, 877-924
- Hemphill, A.; Müller, N.; Sager, H.; Gottstein, B. (2000b):
Neospora caninum und Neosporose - Grundlagenforschung am Institut für
Parasitologie und mögliche Anwendungen.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 142, 257-261
- Heydorn, A.O. und Mehlhorn, H. (2001):
Further remarks on *Hammondia hammondi* and the taxonomic importance of obligate
heteroxeny.
Parasitol. Res. 87, 573-577
- Heydorn, A.O. und Mehlhorn, H. (2002):
A re-evaluation of *Neospora* and *Hammondia* spp.
Trends Parasitol. 18 (6):246

- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. (1993):
Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.
Biotechnology (N Y). 1993 Sep;11(9):1026-30.
- Ho, M.S.Y.; Barr, B.C.; Rowe, J.D.; Anderson, M.L.; Sverlow, K.W.; Packham, A.;
Marsh, A.E.; Conrad, P.A. (1997a):
Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe
hybridization.
J. Parasitol. 83, 508-514
- Ho, M.S.Y.; Barr, B.C.; Tarantal, A.F.; Lai, L.T.Y.; Hendrickx, A.G.; Marsh, A.E.;
Sverlow, K.W.; Packham, A.E.; Conrad, P.A. (1997b):
Detection of *Neospora* from Tissues of Experimentally Infected Rhesus Macaques by
PCR and Specific DNA Probe Hybridization.
J. Clin. Microbiol. 35, 1740-1745
- Hobson, J.C.; Duffield, T.F.; Kelton, D.; Lissemore, K.; Hietala, S.K. (2002):
Neospora caninum serostatus and milk production of Holstein cattle.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 221, 1160-1164
- Howe, D.K.; Crawford, A.C.; Lindsay, D.; Sibley, L.D. (1998):
The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are
homologous of the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*.
Infect. Immun. 66, 5322-5328
- Huong, L.T.T.; Ljungström, B.L.; Uggla, A.; Björkman, C. (1998):
Prevalance of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and
water buffaloes in southern Vietnam.
Vet. Parasitol. 75, 53-57
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. (1981):
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a
comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures
J. Histochem. Cytochem. 29, 577 – 580
- Ibelgaufits H. (1993):
Gentechnologie von A bis Z
VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim
- Illanes, O.; Moore, A.; Pringle, J.; Saindon, A. (1994):
Neospora-induced congenital myelitis and polyradiculoneuritis in a one-month-old
Holstein calf.
Can. Vet. J. 35, 653-654
- Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D.
The host-parasite relationship in bovine neosporosis.
Vet Immunol Immunopathol. 2005 Oct 18;108(1-2):29-36. Review.
- Jardine, J.E. und Wells, B.H. (1995):
Bovine neosporosis in Zimbabwe.
Vet. Rec. 137, 223
- Jenkins, M.C.; Wouda, W.; Dubey, J.P. (1997):
Serological Response over Time to Recombinant *Neospora caninum* Antigens in
Cattle after a Neosporosis-Induced Abortion.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4, 270-274
- Jenkins M, Baszler T, Bjorkman C, Schares G, Williams D
Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion.
Int J Parasitol. 2002 May;32(5):631-6. Review.

- Jensen, A.M.; Björkman, C.; Kjeldsen, A.M.; Wedderkopp, A.; Willadsen, C.; Uggla, A.; Lind, P. (1999):
Associations of *Neospora. caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish herds.
Prev. Vet. Med. 40, 151-163
- Joachim, A. und Edelhofer, R. (2004):
Neues zur Verbreitung und Bedeutung der Neosporose bei Rindern in Österreich
Handout des Institutes der Parasitologie und Zoologie der Universität für Veterinärmedizin Wien
- Kaufmann, H.; Yamage, M.; Roditi, I.; Dobbelaere, D.; Dubey, J.P.; Holmdahl, O.J.M.; Trees, A.; Gottstein, B. (1996):
Discrimination of *Neospora. caninum* from *Toxoplasma. gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR.
Mol. Cell. Probes 10, 289-297
- Kreutzig, T. (1994):
Immunchemie.
In: *Biochemie*. 8. Auflage: 267-291
Jungjohann Verlag mbH, Neckarsulm, Stuttgart
- Lämmle, C. und Hartwig, H. (1995):
Actinomyces pyogenes und *Arcanobacterium haemolyticum*.
In: *Handbuch der bakteriellen Infektionskrankheiten bei Tieren*. Band II, 3. Auflage: 1963, S. 240
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- Lally, N.; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1996a):
Development of a Polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene.
Mol. Biochem. Parasitol. 75, 169-178
- Lally, N.; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1996b):
Evaluation of Two *Neospora caninum* Recombinant Antigens for Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Bovine Neosporosis.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 3, 275-279
- Larson, L.I. (1988):
Immunocytochemistry: Theory and Practice
CRC Press, Florida
- Lindsay, D.S. (2001):
Neosporosis: an emerging protozoal disease of horses.
Equine Vet. J. 33, 116-118
- Lindsay, D.S. und Dubey, J.P. (1989a):
Evaluation of Anti-coccidial Drugs. Inhibition of *Neospora. caninum* Development in Cell Cultures.
J. Parasitol. 75, 990-992
- Lindsay, D.S. und Dubey, J.P. (1989b):
Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections.
Am. J. Vet. Res. 50, 1981-1983
- Lindsay, D.S. und Dubey, J.P. (1989c):
Neospora caninum (protozoa: Apicomplexa) infections in mice.
J. Parasitol. 75, 772-779

Lindsay, D.S.; Speer, C.A.; Toivio-Kinnucan, M.A.; Dubey, J.P.; Blagburn, B.L. (1993): Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*.
Am. J. Vet. Res. 54, 103-106

Lindsay, D.S.; Kelly, E.J.; McKown, R.D.; Stein, F.J.; Plozer, J.; Herman, J.; Blagburn, B.L.; Dubey, J.P. (1996c):
Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Antibodies in Coyotes (*Canis latrans*) and Experimental Infections of Coyotes with *Neospora caninum*.
J. Parasitol. 82, 657-659

Lindsay, D.S.; Little, S.E.; Davidson, W.R. (2002):
Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer, *Odocoileus virginianus* from the southeastern United States.
J. Parasitol. 88, 415-417

Löffler, G. und Petrides, P.E. (1997):
Biochemie und Pathobiochemie (5. Auflage)
Springer Verlag GmbH

Löschenberger, K.; Rössel, C.; Edelhofer, R.; Suchy, A.; Prosl, H. (2000):
Diagnose von *Neospora caninum* beim Hund anhand eines Fallbeispiels.
Tierärztl. Prax. 28 (K), 390-394

Lotthammer, K.H. (1991):
BVD-Aborte in den Sommermonaten.
Verhandlungsber. 19. Kongreß der DVG, Bad Nauheim, 115-123.

Louie, K.; Sverlow, K.W.; Barr, B.C.; Anderson, M.L.; Conrad, P.A. (1998):
Cloning and Characterization of Two Recombinant *Neospora* Fragments and Their Use in Serodiagnosis of Bovine Neosporosis.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. Nov, 692-699

Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, Innes EA (2004):
Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy.
J Comp Pathol. 2004 Aug-Oct;131(2-3):142-56.

Mackay I.M.; Mackay J.F.; Nissen M.D.; Sillots T.P. (2007):
Real Time PCR in Microbiology- From Diagnosis to Characterization
Caister Academic Press (2007): S. 1-39

Magnino, S.; Vigo, P.G.; Fabbi, M.; Colombo, M.; Bandi, C.; Genchi, C. (1999):
Isolation of bovine *Neospora* from a newborn calf in Italy.
Vet. Rec. 144, 456

Mainar-Jaime, R. C.; Thurmond, M.C.; Berzal-Herranz, B.; Hietala, S.K. (1999):
Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain.
Vet. Rec. 145, 72-75

Maley SW, Buxton D, Rae AG, Wright SE, Schock A, Bartley PM, Esteban-Redondo I, Swales C, Hamilton CM, Sales J, Innes EA.
The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation.
J Comp Pathol. 2003 Aug-Oct;129(2-3):186-95.

Marsh, A.E.; Barr, B.C.; Packham, A.E.; Conrad, P.A. (1998):
Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae).
J. Parasitol. 84, 983-991

McAllister, M.M.; Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Jolley, W.R.; Wills, R.A.; McGuire, A.M. (1998a):
Dogs are the definitive hosts of *Neospora caninum*.
Int. J. Parasitol. 28, 1473-1478

McAllister, M.M.; Jolley, W.R.; Wills, R.; Lindsay, D.S.; McGuire, A.M.; Tranas, J.D. (1998b):
Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*.
Am. J. Vet. Res. 59, 441-444

McKeand JB(1998):
Molecular diagnosis of parasitic nematodes.
Parasitology. 1998;117 Suppl:S87-96. Review.

McKenzie, C.D. (1992):
Immunocytochemistry
In: Roitt, I.M. und Delves, P.J.(eds):
Encyclopedia of immunology, Vol. 2, Academic Press, London- New York, 783-790

McNamée, P.T.; Trees, A.J.; Guy, F.; Moffet, D.; Kilpatrick, D. (1996):
Diagnosis and prevalence of neosporosis in cattle in Northern Ireland.
Vet. Rec. 138, 419-420

Mehlhorn, H. und Heydorn, A.O. (2000):
Neospora caninum: Is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion.
Parasitol. Res. 86, 169-178

Milburn, H.; Kipar, A.; Rosbottom, A.; Guy, C.; Smith, R.; Williams, D. (2004):
Infection of cattle with *Neospora caninum* in early and late gestation – Differences in parasite distribution and lesions in the foetus and placenta
Handout vom 22nd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology in Olsztyn (Poland)
15.-18.9.2004

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res. 1988 Feb 11;16(3):1215. No abstract available.

Mitchell G, Barton MG (1986):
Bovine abortion associated with *Bacillus licheniformis*.
Aust Vet J. 1986 May; 63(5):160-1. No abstract available.

Moen, A.R.; Wouda, W.; Mul, M.F.; Graat, E.A.M.; van Werfen, T. (1998):
Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds.
Theriogenology 49, 1301-1309

Moennig, V. (1997):
Bovine Virusdiarrhoe.
In: Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere. 1. Auflage: 41-44
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, Liess, B. (Hrsg.)

Morales, E.S.; Trigo, F.J.; Ibarra, F.V.; Puente, E.C.; Santacruz, M. (2001):
Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico.
J. Vet. Diagn. Invest. 13, 413-415

Morgan UM, Thompson RC (1998):
Molecular detection of parasitic protozoa.
Parasitology. 1998;117 Suppl:S73-85. Review.

- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT
Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification.
Biotechniques. 1998 Jun;24(6):954-8, 960, 962.
- Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. (1996):
Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay.
J Clin Microbiol. 1996 Nov;34(11):2850-2.
- Müller N, Vonlaufen N, Gianinazzi C, Leib SL, Hemphill A.(2002):
Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue.
J Clin Microbiol. 2002 Jan;40(1):252-5.
- Müller, M., Zetzmann, K., Kaul, S., Weber, A. (2004):
Sektionsbefunde bei Rindern aus Nordbayern in den Jahren 2002 und 2003.
Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle 11, 195-200.
- Müller, M., Mölle, G., Ewringmann, T. (2005):
Abortfälle beim Rind infolge Infektion mit *Bacillus licheniformis*.
Tierärztl. Umschau 60, 258-262.
- Müller, N.; Zimmermann, V.; Hentrich, B.; Gottstein, B. (1996):
Diagnosis of *Neospora. caninum* and *Toxoplasma. gondii* Infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay.
J. Clin. Microbiol. 34, 2850-2852
- Mugridge, N.B.; Morrison, D.A.; Heckerroth, A.R.; Johnson, A.M.; Tenter, A.M. (1999):
Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than *Toxoplasma gondii*.
Int. J. Parasitol. 29, 1545-1556
- Muir P, Ras A, Klapper PE, Cleator GM, Korn K, Aepinus C, Fomsgaard A, Palmer P, Samuelsson A, Tenorio A, Weissbrich B, van Loon AM.
Multicenter quality assessment of PCR methods for detection of enteroviruses.
J Clin Microbiol. 1999 May;37(5):1409-14.
- Nietfeld, J.C.; Dubey, J.P.; Anderson, M.L.; Libal, M.C.; Yaeger, M.Y.; Neiger, R.D. (1992):
Neospora-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle.
J. Vet. Diagn. Invest. 4, 223-226
- N.N. (2000):
Vorlesungs-Handout des Institutes für Parasitologie der LMU München
Wintersemester 2000
- Obendorf, D.L.; Murray, N.; Veldhuis, G.; Munday, B.L.; Dubey, J.P. (1995):
Abortion caused by Neosporosis in cattle.
Aust. Vet. J. 72, 117-120
- Ogino, H.; Watanabe, E.; Watanabe, S.; Agawa, H.; Narita, M.; Haritani, M.; Kawashima, K. (1992):
Neosporosis in an Aborted Fetus and Newborn Calf.
J. Comp. Path. 107, 231-237
- Ortega-Mora LM, Ferre I, del-Pozo I, Caetano-da-Silva A, Collantes-Fernandez E, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Aduriz G.(2003):
Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls.
Vet Parasitol. 2003 Nov 28;117(4):301-8.

- Osawa, T.; Wastling, J.; Maley, S.; Buxton, D.; Innes, E.A.. (1998):
A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera.
Vet. Parasitol. 79, 19-34
- Otter, A.; Jeffrey, M.; Griffith, I.B.; Dubey, J.P. (1995):
A survey of the incidence of *Neospora. caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales.
Vet. Rec. 136, 602-606
- Otter, A.; Jeffrey, M.; Scholes, S.F.E.; Helmick, B.; Wilesmith, J.W.; Trees, A.J. (1997a):
Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis.
Vet. Rec. 141, 487-489
- Otter, A.; Wilson, B.W.; Scholes, S.F.E.; Jeffrey, M.; Helmick, B.; Trees, A.J. (1997b):
Results of a survey to determine whether *Neospora* is a significant cause of ovine abortion in England and Wales.
Vet. Rec. 140, 175-177
- Ould-Amrouche, A.; Klein, F.; Osdoit, C.; Mohammed, H.O.; Touratier, A.; Sanaa, M.; Mialot, J.P. (1999):
Estimation of *Neospora caninum* seroprevalance in dairy cattle from Normandy, France.
Vet. Res. 30, 531-538
- Packham, A.E.; Sverlow, K.W.; Conrad, P.A.; Loomis, E.F.; Rowe, J.D.; Anderson, M.L.; Marsh, A.E.; Cray, C.; Barr, B.C. (1998):
A Modified Agglutination Test for *Neospora. caninum*: Development, Optimazation and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5, 467-473
- Paré, J.; Thurmond, M.C.; Hietala, S.K. (1994):
Congenital *Neospora* infection in dairy cattle.
Vet. Rec. 134, 531-532
- Paré, J.; Hietala, S.K.; Thurmond, M.C. (1995a):
An enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora. sp.* infections in cattle.
J. Vet. Diagn. Invest. 7, 352-359
- Paré, J.; Hietala, S.K.; Thurmond, M.C. (1995b):
Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle.
J. Vet. Diagn. Invest. 7, 273-275
- Paré, J.; Thurmond, M.C.; Hietala, S.K. (1996):
Congenital *Neospora caninum* Infection in Dairy Cattle and Associated Calfhood Mortality.
Can. J. Vet. Res. 60, 133-139
- Paré, J.; Thurmond, M.C.; Hietala, S.K. (1997):
Neospora caninum antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion.
J. Parasitol. 83, 82-87
- Paré, J.; Fecteau, G.; Fortin, M.; Marsolais, G. (1998):
Seroepidemic study of *Neospora caninum* in dairy herds.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 213, 1595-1598

- Patitucci, A.N. (1995):
The use of immunohistochemistry for the diagnosis of neosporosis in cattle and dogs.
N. Z. Vet. J. 43, 124
- Paton MG, Karunaratne SH, Giakoumaki E, Roberts N, Hemingway J.
Quantitative analysis of gene amplification in insecticide-resistant *Culex* mosquitoes.
Biochem J. 2000 Feb 15;346 Pt 1:17-24
- Paula VS, Rodrigues AA, Richtzenhain LJ, Cortez A, Soares RM, Gennari SM(2004):
Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses.
Vet Res Commun. 2004 Oct;28(7):581-5. No abstract available.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Perez-Perez V, Espi-Felgueroso A, Alvarez-Garcia G, Collantes-Fernandez E, Ortega-Mora LM.:
Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain.
Vet Parasitol. 2003 Feb 13;111(2-3):143-52
- Peters, M.; Luttkefels, E.; Heckeroth, A.R.; Schares, G. (1999/2000):
Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany.
Parasitol. Res. 86, 1-7
- Peters, M.; Lütkefels, E.; Heckeroth, A.R.; Schares, G. (2001):
Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle.
Int. J. Parasitol. 31, 1144-1148
- Petersen, E.; Lebech, M.; Jensen, L.; Lind, P.; Rask, M.; Bagger, P.; Björkman, C.; Ugglä, A. (1999):
Neospora caninum infection and repeated abortions in humans.
Emerg. Inf. Dis. 5, 278-280
- Pfister, K. (2002):
Die Neosporose des Rindes.
Vet-MedReport Sonderausgabe V3/26, 10-11
- Pitel, P.H.; Pronost, S.; Romand, S.; Thulliez, P.; Fortier, G.; Ballet, J.J. (2001):
Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in France.
Equine Vet. J. 33, 205-207
- Plagemann, O. und Weber, A. (1993):
Der Schimmelpilz *Mortierella wolfii*. als Ursache von sporadischen Aborten beim Rind.
Tierärztl. Umschau 48, 559-563
- Quinn, H.; Ellis, J.; Smith, N. (2002):
Neospora caninum: a cause of immune-mediated failure of pregnancy?
Trends Parasitol. 18, 391
- Quintanilla-Gozalo, A.; Pereira-Bueno, J.; Tabarés, E.; Innes, E.A.; Gonzalés-Paniello, R.; Ortega-Mora, L.M. (1999):
Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain.
Int. J. Parasitol. 29, 1201-1208
- Reichel, M.P. und Drake, J.M. (1996):
The diagnosis of *Neospora* abortions in Cattle.
N. Z. Vet. J. 44, 151-154

- Reitt, K., Hilbe, M., Voegtlin, A., Corboz, L., Haessig, M., Pospischil, A. (2007):
Aetiology of Bovine Abortion in Switzerland from 1986 to 1995 – A Retrospective
Study with Emphasis on Detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by
PCR.
J. Vet. Med. A 54, 15-22.
- Richter und Götze (1994) :
Tiergeburtshilfe,
Hrsg.:Grunert-Arbeiter,
Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin
- Rogers BB, Mark Y, Oyer CE.
Diagnosis and incidence of fetal parvovirus infection in an autopsy series: I. Histology.
Pediatr Pathol. 1993 May-Jun;13(3):371-9.
- Romand, S.; Thulliez, P.; Dubey, J.P. (1998):
Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection.
Parasitol. Res. 60, 50-53
- Rommel, M. (2000):
Protozoeninfektionen der Wiederkäuer
In: Veterinärmedizinische Parasitologie. 5. Auflage, 121-191
Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg, Boch, J. und Supperer, R. (Hrsg.)
- Ryan, A.J. (1970):
Abortion in cattle associated with *Bacillus licheniformis*
Vet Rec. 1970 May 30; 86 (22): 650-1
- Sager, H.; Gottstein, B. (1996):
Diagnostik- Informationen: NEOSPOROSE
Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen und der Medizinischen Fakultät
Universität Bern
[www:http://paraserver.unibe.ch](http://paraserver.unibe.ch)
S.1-4
- Sager, H.; Fischer, I.; Furrer, K.; Strasser, M.; Waldvogel, A.; Boerlin, P.; Audigé, L.;
Gottstein, B. (2001):
A. Swiss-control. study. to. assess. *Neospora. caninum*-associated. bovine. abortions.
by. PCR, histopathology and Serology..
Vet. Parasitol. 102, 1-15
- Schares, G.; Peters, M.; Wurm, R; Tackmann, K.; Henning, K.; Conraths, F.J. (1997):
Neospora caninum verursacht Aborte in einem Rinderbestand in Nordrhein-Westfalen.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 104, 189-228
- Schares, G.; Peters, M.; Wurm, R.; Bärwald, A.; Conraths, F.J. (1998):
The efficiacy of vertical transmission of *Neospora. caninum* in dairy cattle analysed
by serological techniques.
Vet. Parasitol. 80, 87-98
- Schares, G.; Conraths, F.J.; Reichel, M.P. (1999):
Bovine Neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a
dairy herd in New Zealand..
Int. J. Parasitol. 29, 1659-1667
- Schares G, Rauser M, Zimmer K, Peters M, Wurm R, Dubey JP, de Graaf DC,
Edelhofer R, Mertens C, Hess G, Conraths FJ.
Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic
abortions.
J Parasitol. 1999 Aug;85(4):688-94

Schares G, Rauser M, Sondgen P, Rehberg P, Barwald A, Dubey JP, Edelhofer R, Conraths FJ (2000):

Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis.

Int J Parasitol. 2000 Sep;30(10):1123-30.

Schares, G.; Heydorn, A.O.; Cüppers, A.; Conraths, F.J.; Mehlhorn, H. (2001a): Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts.

Parasitol. Res. 87, 873-877

Schares, G.; Heydorn, A.O.; Cüppers, A.; Conraths, F.J.; Mehlhorn, H. (2001b): *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished.

Parasitol. Res. 87, 808-816

Schares, G.; Wenzel, U.; Müller, T.; Conraths, F.J. (2001c):

Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes

(*vulpes vulpes*).

Int. J. Parasitol. 31, 418-423

Schares, G.; Bärwald, A.; Staubach, C.; Sondgen, P.; Rauser, M.; Schröder, R.;

Peters, M.; Wurm, R.; Selhorst, T.; Conraths, F.J. (2002a):

p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*- associated bovine abortion.

Vet. Parasitol. 106, 293-305

Schares, G.; Heydorn, A.O.; Cüppers, A.; Mehlhorn, H.; Geue, L.; Peters, M.;

Conraths, F.J. (2002b):

In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues.

Parasitol. Res. 88, 44-52

Schares G, Barwald A, Staubach C, Ziller M, Kloss D, Wurm R, Rauser M, Labohm R, Dräger K, Fasen W, Hess RG, Conraths FJ.

Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by Logistic regression.

Int J Parasitol. 2003 Dec;33(14):1631-40.

Schares G, Barwald A, Staubach C, Ziller M, Kloss D, Schroder R, Labohm R, Dräger K, Fasen W, Hess RG, Conraths FJ.

Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers.

Parasitology. 2004 Sep;129(Pt 3):301-9.

Schares G, Pantchev N, Barutzki D, Heydorn AO, Bauer C, Conraths FJ

Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and

Hammondia hammondi in faeces collected from dogs in Germany.

Int J Parasitol. 2005 Dec;35(14):1525-37. Epub 2005 Sep 15.

Schares, G. und Conraths, F.J. (2007):

Neospora caninum als Abortursache bei Rindern- Neues zur Pathogenese, Epidemiologie und Diagnose

Der praktische Tierarzt 88, Heft 9, 730- 740

Schock, A.; Buxton, D.; Spence, J.A.; Low, J.C.; Baird, A. (2000):

Histopathological survey of aborted fetuses in Scotland with special reference to *Neospora*.

caninum.

Vet. Rec. 147, 687-688

- Schweighardt, H. (1991):
Spezifische Abortursachen bei Rind und Schaf unter besonderer Berücksichtigung der mikrobiellen Erreger (Protozoen, Bakterien, Pilze).
Wien. Tierärztl. Msch. 78, 2-6
- Söndgen, P.; Peters, M.; Bärwald, A.; Wurm, R.; Holling, F.; Conraths, F.J.; Schares, G. (2001):
Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology
Vet. Parasitol. 2187(2001), 1-12
- Speer, C.A. und Dubey, J.P. (1989):
Ultrastructure of Tachyzoites, Bradyzoites and Tissue Cysts of *Neospora caninum*.
J. Parasitol. 36, 458-463
- Sternberger, L.A., Hardy, P.H., Cuculis, J.J., Meyer, H.G. (1970):
The unlabeled antibody enzyme method for immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochaetes.
J. Histochem. Cytochem. 18, 315- 333
- Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Bjorkman C
Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*.
Vet Parasitol. 1999 Sep 1;85(4):227-34.
- Straub, O.C. (1982):
Über die Ursache von Aborten beim Rind
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95, 161-164
- Stryer, L. (1988):
Molekulare Immunologie
In: Biochemie. 4. Auflage: 925-956
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Swift BL, Kennedy PC
Experimentally induced infection of in utero bovine fetuses with bovine parainfluenza 3 virus.
Am J Vet Res. 1972 Jan;33(1):57-63
- Tenter, A.M. und Johnson, A.M. (1997):
Phylogeny of the Tissue Cyst-forming Coccidia.
Adv. Parasitol. 39, 70-139
- Thilsted, J.P. und Dubey, J.P. (1989):
Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle.
J. Vet. Diagn. Invest. 1, 205-209
- Thurmond, M.C.; Anderson, M.L.; Blanchard, P.C. (1995):
Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows.
J. Parasitol. 81, 364-367
- Thurmond, M.C.; Hietala, S.K.; Blanchard, P.C. (1997):
Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission.
J. Vet. Diagn. Invest. 9, 44-49
- Thurmond, M.C. und Hietala, S: K. (1997a):
Effect of congenitally acquired *Neospora. caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle.
Am. J. Vet. Res. 58, 1381-1385

- Thurmond, M.C. und Hietala, S.K. (1997b):
Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 210, 672-674
- Thurmond, M.C. und Hietala, S.K. (1999):
Neospora caninum infection and abortion in cattle.
In: Current Veterinary Therapy 4, Food Animal Practice, 1. Edition: 425-431
Practice, Saunders, Philadelphia, PA, Smith, H. (Ed.)
- Travaglini EC.(1973):
Methods for the extraction and purification of deoxyribonucleic acids from eukaryote cells.
Methods Cell Biol. 1973;7:105-27. No abstract available.
- Trees, A.J.; Guy, F.; Low, J.C.; Roberts, L.; Buxton, D.; Dubey, J.P. (1994):
Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle.
Vet. Rec. 134, 405-407
- Trees, A.J.; Davison, H.C.; Otter, A. (1998):
Bovine abortion, *Neospora caninum* and dogs.
Vet. Rec. 143, 343
- Trees, A.J.; Davison, H.C.; Innes, E.A.; Wastling, J.M. (1999):
Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis.
Int. J. Parasitol. 29, 1195-1200
- Trees, A.J.; McAllister, M.; Guy, C.; McGarry, J.; Smith, R.; Williams, D. (2002):
Neospora caninum: oocyst challenge of pregnant cows.
Vet. Parasitol. 109, 147
- Uggla, A.; Stenlund, S.; Holmdahl, O.J.M.; Jakubek, E.B.; Thebo, P.; Björkman, C. (1998):
Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves.
Int. J. Parasitol. 28, 1467-1472
- Van Maanen, C.; Wouda, W.; Schares, G.; von Blumröder, D; Conraths, F.J.; Norton, R.; Williams, D.J.L.; Esteban-Redondo, I.; Innes, E.A.; Mattsson, J.G.; Björkman, C.; Fernández-García, A.; Ortega-Mora, L.M.; Müller, N.; Sager, H.; Hemphill, A. (2004):
An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues
Vet. Parasitol. 126, 351-364
- Voet, D. und Voet, J.G., Herausgeber, (1994):
Biochemie
VCH Verlagsgesellschaft mbH
- Volkin E. und Carter C.E. (1951):
The preparation and properties of mammalian ribonucleic acids
J. Am. Chem. Soc. 73: 1516-1519
- von Blumroder D, Schares G, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Wright S, Bjorkman C, Frossling J, Risco-Castillo V, Fernandez-Garcia A, Ortega-Mora LM, Sager H, Hemphill A, van Maanen C, Wouda W, Conraths FJ.
Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines.
Vet Parasitol. 2004 Feb 26;120(1-2):11-22.
- Von Hippel P.H. und Wong K.-W. (1964):
Neutral salts: the generality of their effects on the stability of macromolecular conformations
Science 145: 577- 580

- Waldner C, Checkley S, Blakley B, Pollock C, Mitchell B.(2002):
Managing lead exposure and toxicity in cow-calf herds to minimize the potential for food residues.
J Vet Diagn Invest. 2002 Nov;14(6):481-6.
- Wallace DM.
Precipitation of nucleic acids.
Methods Enzymol. 1987;152:41-8. No abstract available.
- Weber, A.; Roth, M.; Ewringmann, T.; Keller, B. (1997):
Aborte beim Rind - mikrobiologische Befunde.
Prakt. Tierarzt 78, 672-679
- Weber, A.; Zetzmann, K.; Ewringmann, T. (2000):
Vorkommen von Antikörpern gegen Neospora. caninum bei Kühen in nordbayerischen Beständen mit Abortproblemen.
Tierärztl. Umschau 55, 28-29
- Williams, D.J.L.; Davison, H.C.; Helmick, B.; McGarry, J.; Guy, F.; Otter, A.; Trees, A.J. (1999):
Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to Neospora. caninum in cattle.
Vet. Rec. 145, 571-575
- Williams, D.J.L.; Guy, C.S.; McGarry, J.W.; Guy, F.; Tasker, L.; Smith, R.F.; MacEachern, K.; Cripps, P.J.; Kelly, D.F.; Trees, A.J. (2000):
Neospora. caninum-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival.
Parasitology 121, 347-358
- Williams, J.H.; Espie, I.; van Wilpe, E.; Matthee, A. (2002):
Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf.
J. S. Afr. Vet. Assoc. 73, 38-43
- Wink, M. & H. Wehrle (eds.),1994:
PCR (Polymerase Kettenreaktion) im medizinischen und biologischen Labor.
Handbuch für den Praktiker.
Git Verlag, Darmstadt, 295 Seiten, 1994
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP
Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.
Biotechniques. 1997 Jan;22(1):130-1, 134-8.
- Wouda, W. (2000):
Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review.
Vet Q. 22(2):71-74.
- Wouda, W.; de Gee, A.L.M.; Moen, A.R.; Van Knapen, F. (1995):
Laboratory experiences with bovine Neospora abortion in Dutch dairy herds.
Proc. Symp. Neospora Abortus Bij Het Rund, 3-9
- Wouda, W.; Dubey, J.P.; Jenkins, M.C. (1997a):
Serological Diagnosis of Bovine Fetal Neosporosis.
J. Parasitol. 83, 545-547

- Wouda, W.; Moen, A.R.; Visser, I.J.R.; van Knapen, F. (1997b):
Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver.
J. Vet. Diagn. Invest. 9, 180-185
- Wouda, W.; Brinkhof, J.; van Maanen, C.; de Gee, A.L.W.; Moen, A.R.. (1998a):
Serodiagnosis of Neosporosis in Individual Cows and Dairy Herds: A Comparative Study of Three Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5, 711-716
- Wouda, W.; Moen, A.R.; Schukken, Y.H. (1998b):
Abortion risk of cows after a Neospora caninum epidemic.
Theriogenology 49, 1311-1316
- Wouda, W.; Bartels, C.J.M.; Moen, A.R. (1999a):
Characteristics of Neospora. caninum-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997).
Theriogenology 52, 233-245.
- Wouda, W.; Dijkstra, T.; Kramer, A.M.H.; van Manen, C.; Brinkhof, J.M.A. (1999b):
Seroepidemiological evidence for a relationship between Neospora. caninum infections in dogs and cattle.
Int. J. Parasitol. 29, 1677-1682
- Wyss, R.; Sager, H.; Müller, N.; Inderbitzin, F.; König, M.; Audigé, L.; Gottstein, B. (2000):
Untersuchungen zum Vorkommen von Toxoplasma. gondii und Neospora. caninum unter fleischhygienischen Aspekten.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 142, 95-108
- Xu HW, Jevnikar AM, Rubin-Kelley VE.(1990):
A simple method for the preparation of chromosomal DNA from cell culture.
Nucleic Acids Res. 1990 Aug 25;18(16):4943. No abstract available.
- Yamaguchi, M.; Flechtner, O.; Gottstein, B. (1996):
Neospora caninum: specific oligonucleotide primers for the detection of brain cyst DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR).
J. Parasitol. 82, 272-279

Danksagung und Lebenslauf**Danksagung**

Herrn Dr. M. Müller danke ich sehr herzlich für die Auswahl des interessanten und methodisch sehr abwechslungsreichen Themas, seine jederzeit freundliche und intensive Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und auch für seine kritische und sehr zügige Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. W. Schmahl danke ich ebenfalls sehr herzlich für seinen Einsatz, dass ich die Arbeit in Erlangen verwirklichen konnte und für die Zustimmung zu diesem Thema.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Schares für das Bereitstellen der Antikörper und Klone sowie für die serologischen Untersuchungen am Friedrich Loeffler Institut in Wusterhausen.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Peters vom Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg, der mir ein in Paraffin eingebettetes Gehirn eines jungen Hundes mit *Neospora caninum*-bedingter Enzephalitis als Positivkontrolle für die Immunhistologie zur Verfügung stellte.

Weiter möchte ich allen Mitarbeitern des Fachlabors Veterinärmedizin des Analyse- und Diagnostikzentrums Nord des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit unter der Leitung von Herrn Dr. K.-H. Bogner für die freundliche Unterstützung im praktischen Teil der Arbeit und für die Bereitstellung der Arbeitsplätze im Untersuchungsamt danken.

An dieser Stelle möchte ich namentlich alle die erwähnen, die mir bei den praktischen Durchführungen stets mit Rat und Tat zur Seite standen und meine zahllosen Fragen geduldig beantwortet haben:

Bereich Pathologie:

Herr Puchta und Frau Krisch

Bereich Mikrobiologie:

Frau Zetzmann, Frau Noras, Herr Huber, Frau Ostermann

Bereich PCR:

Herr Dr. Bogner , Herr Neuß,

Bereich Serologie:

Herr Dr. Singer, Herr Dr. Schmidt, Frau Kämpfer, Frau Lenz, Herr Krolovitsch

Dank auch all denen, die für eine freundliche Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und hier nicht namentlich erwähnt wurden.

Und nicht zuletzt auch ein großes Dankeschön an meine Eltern, meinen Mann Kai-Uwe, den Schwiegereltern und meine Oma ohne deren Hilfe die Arbeit nur schwer zu verwirklichen gewesen wäre. Vor allem jedoch danke ich meiner Mutter, die mir während der Arbeit die Kinder so liebevoll betreut und den Rücken frei gehalten hat. Und auch meinem Vater, der mir das Studium ermöglicht hat und während der Arbeit leider verstorben ist.

Zuletzt möchte ich noch Herrn Dr. Eike Schuster für seine liebe Unterstützung und Hilfe beim Gegenlesen der Arbeit danken.

Lebenslauf**Personalien**

Name: Stephanie Christina Sörgel,
geb. Löhner

Geburtsdatum: 4. November 1975

Geburtsort: Erlangen

Konfession: röm.-kath.

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Ehemann: Kai- Uwe Sörgel

Kinder: Sarah- Julie Sörgel
Adrian - Emilio Sörgel

Eltern: Hans-Gregor Löhner,
Diplom-Kaufmann
Anita Löhner, geb. Kunzl,
selbständig

Werdegang

Schulbildung: Grundschule Eschenau:
1982- 1985

Grundschule Eckenheid:
1985- 1986

Gymnasium Lauf a.d. Peg.:
1986- 1993

Albert Schweitzer Gymnasium Erlangen:
1993-1995

Studium:	<p>Friedrich Alexander Universität Erlangen/Nürnberg WS 95 Grundschullehramt SS 96 Zahnmedizin</p> <p>Justus Liebig Universität Giessen WS 96 bis SS 97 Veterinärmedizin</p> <p>Ludwig Maximilians Universität München WS 97 bis SS 04 (inkl. 2 Mutterschutzbeurlaubungen) Veterinärmedizin</p>
Approbation als Tierärztin:	1. Juli 2004
Dissertation:	seit November 2004
Berufliche Tätigkeiten:	<p>Vertretungen in Kleintierpraxen diverse Praktika</p>